



---

**seit 1548**

*Friedrich-Schiller-Universität Jena*

*Biologisch-Pharmazeutische Fakultät*

*Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie*

*Anlage 4 der Promotionsordnung gemäß § 8 Abs. 4*

**Die Rolle des Gens Disrupted-in-Schizophrenia-1  
(DISC1) während der tangentialen Migration  
kortikaler Interneurone der Maus**

experimentelle

**DOKTORARBEIT**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von Dipl. Biologe André Steinecke

geboren am 21.06.1983 in Gotha

Jena, 2013



1. Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Bolz  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstr. 1  
07743 Jena

2. Gutachter:

Dr. Christoph Kaether  
Fritz-Lippmann-Institut  
Beutenbergstr. 11  
07745 Jena

3. Gutachter:

Dr. Dominique Bagnard  
Université de Strasbourg  
INSERM 1109 – MN3t Lab The Microenvironmental Niche in  
tumorigenesis and targeted therapy  
3, Avenue Molière - 67200 Strasbourg

Datum der Disputation: 22.07.2013

„Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,  
Er will uns Stuf' um Stufe heben, weiten.  
Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise  
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,  
Nur wer bereit zu Aufbruch ist und Reise,  
Mag lähmender Gewöhnung sich entrafen.“

Aus „Stufen“  
von Hermann Hesse



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Die Embryonalentwicklung des Neokortex.....	4
1.2 Radiale und tangentielle Migration neuronaler Zellen des Kortex.....	6
1.3 Interneurone werden mit Hilfe von Lenkungsmolekülen in den Kortex geleitet.....	9
1.4 Der Migrationsmodus kortikaler Interneurone.....	11
1.5 DISC1 stellt ein Risikogen für Schizophrenie dar.....	13
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Chemikalien .....	19
3.2 Geräte und Materialien .....	21
3.3 Enzyme und dazugehörige Puffer .....	22
3.4 Antikörper.....	22
3.5 Rezepturen, Puffer und Medien.....	23
3.6 Versuchstiere .....	26
3.7 Molekularbiologische Methoden.....	26
3.7.1 Gewebepreparation des adulten Hippocampus und der medialen ganglionischen Eminenz des Embryonaltages E14,5.....	27
3.7.2 cDNA-Synthese aus primären Gewebeproben .....	27
3.7.3 Nachweis spezifischer mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
3.8 Primärkultur .....	29
3.8.1 Herstellung primärer embryonaler Einzelzellen .....	29
3.8.2 Transfektion von embryonalem Primärgewebe mittels ex utero Elektroporation.....	30
3.8.3 Plasmaclot mit transfiziertem Primärgewebe .....	30
3.8.4 Schnittkultur aus transfizierten embryonalen Gehirnen .....	31
3.8.5 Herstellung eines „feeder layers“ zur Visualisierung der Dynamik embryonaler transfizierter Interneurone aus der MGE.....	31
3.9 Immunhisto- und Immunzytochemische Methoden .....	32
3.9.1 Perfusion adulter Mäuse .....	32
3.9.2 Fixieren, Einfrieren und Herstellen von Kryostatschnitten aus Hirngewebe .....	33
3.9.3 Immunhistochemie an Kryostatschnitten .....	33
3.9.4 Immunzytochemie an embryonalen Einzelzellen .....	34
3.10 In utero Elektroporation .....	35
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1 DISC1 ist während der Entwicklung des Gehirns der Maus in Interneuronen der MGE exprimiert .....	37
4.1.1 DISC1 wird am Embryonaltag E14,5 in der MGE transkribiert.....	38
4.1.2 DISC1 ist auf Proteinebene in der MGE am Embryonaltag E14,5 exprimiert .....	38
4.1.3 DISC1 ist in kortikalen Interneuronen der MGE exprimiert und weist eine inhomogene subzelluläre Verteilung auf .....	40
4.2 DISC1 ist notwendig für die korrekte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts.....	41

4.2.1	DISC1 ist in Bereichen dynamischer Fluktuation des Aktin-Zytoskeletts in migrierenden Interneuronen exprimiert .....	42
4.2.2	DISC1 beeinflusst Mediatoren des Zytoskeletts und die Aktin-Reorganisation in Interneuronen .....	45
4.3	<i>Das Herunterregulieren von DISC1 führt zu einem Migrationsdefekt kortikaler Interneurone in vitro ...</i>	49
4.3.1	Der Einfluss von DISC1 auf die Anzahl somaler Translokationen und die Geschwindigkeit kortikaler Interneurone.....	49
4.3.2	DISC1 ist notwendig für die korrekte Migration kortikaler Interneurone im Plasmaclot .....	53
4.3.3	Das Herunterregulieren von DISC1 führt zu einem Migrationsdefekt in Schnittkulturen .....	56
4.4	<i>Die korrekte Expression von DISC1 ist essentiell für eine fehlerfreie tangentielle Migration kortikaler Interneurone in vivo .....</i>	58
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
5.1	<i>DISC1 ist für die korrekte Migration kortikaler Interneurone während der Entwicklung der Maus notwendig .....</i>	64
5.2	<i>DISC1 beeinflusst Mediatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts in neuronalen Zellen .....</i>	69
5.3	<i>DISC1 interagiert mit Aktinkomponenten während der Migration kortikaler Interneurone .....</i>	72
5.4	<i>Die Überexpression von DISC1 führt zur Bildung von Aggresomen .....</i>	77
5.5	<i>Mäuse mit Mutationen im DISC1-Gen zeigen schizophrenierelevante Verhaltensauffälligkeiten .....</i>	78
5.6	<i>Schizophrenie stellt eine multikausale psychiatrische Erkrankung dar .....</i>	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung.....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>
<b>12</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>103</b>
12.1	<i>Abkürzungen.....</i>	103
12.2	<i>Ausgewählte Publikationen .....</i>	105

# 1 Einleitung

Die drei Kantischen Fragen: Was kann ich wissen? Was soll ich tun? und Was kann ich hoffen? münden schließlich in die vierte entscheidende Frage: Was ist der Mensch? Sich dieser letzten Frage in praktischer Hinsicht zu nähern ist unter anderem Aufgabe der Naturwissenschaften bzw. der Anthropologie, aber auch der Hirnforschung. Seit die Menschen der Antike begannen einzelne Organe und Organsysteme zu untersuchen, besteht die Frage nach deren Funktion im lebenden Individuum. So schrieb man in der ägyptischen Gesellschaft den einzelnen Organen nicht nur physiologische, sondern auch geistige und transzendente Eigenschaften zu, wie z.B. dem Herz den Sitz der Seele. Dies mündete in der sog. „Säftelehre“, wonach Organsystemen bzw. dem Verhältnis der Flüssigkeiten des Körpers charakterbildende Eigenschaften zukamen, welche in die vier Grundcharaktäre Melancholiker, Sanguiniker, Phlegmatiker und Choleriker mündeten (Kant, 1798). Aus heutiger Sicht erscheinen diese Ansichten rudimentär, zeigen aber, dass es den Menschen zu allen Zeiten ein Anliegen war sowohl körperliche als auch geistige Unterschiede zwischen den Menschen, aber auch zwischen Mensch und Tier zu ergründen. Man fand heraus, dass das Gehirn für die Ausprägung geistiger Eigenschaften sowie Sinneswahrnehmungen verantwortlich ist. Weiterhin hat sich in den letzten Jahrzehnten bestätigt, dass einige geistige Eigenschaften sowie psychiatrische Erkrankungen, wie z.B. Epilepsie, Huntington- oder Angleman-Syndrom, aber auch Schizophrenie, eine erbliche Komponente beinhalten. So wird mittlerweile angenommen, dass geistige Fähigkeiten sowie psychiatrische Krankheiten auf physiologische Ursachen zurückgehen, welche sich letztlich in zellulären und genetischen Prozessen begründen. Auch die Entstehung des Gehirns als hochkomplexes Organ mit ca. einer Billion Nervenzellen und einer Billiarde Verbindungen beruht letzten Endes auf der Genetik. Mit Hilfe der ca. 20.000 zur Verfügung stehenden proteinkodierenden Gene muss das Gehirn vom Neuralrohr bis zur Vernetzung einzelner Nervenzellen gebildet werden. Das Paradoxon, mit einer geringen Anzahl von Genen ein komplexes Gebilde wie das Gehirn zu generieren, wird durch verschiedene Mechanismen umgangen, wie z.B. raumzeitlich regulierte Expression entwicklungsrelevanter Gene, alternatives Splicing zur Generierung mehrerer Transkriptvarianten eines Gens oder multiple Funktionen einzelner Gene während der Entwicklung und im adulten Organismus.

Um die Funktionsweise des Gehirns zu verstehen, die uns in die Lage versetzt komplexe Vorgänge, wie Bewusstsein, Abstraktion bzw. Lern- und Gedächtnisprozesse zu reali-

sieren sowie krankhafte Veränderungen dieser Struktur zu erkennen, ist es von großer Bedeutung die Entstehung des Nervensystems zu beleuchten. Dazu verhelfen uns experimentelle Ansätze, die es uns ermöglichen die Rolle einzelner Gene während der Entwicklung des Gehirns zu untersuchen. Ein Ansatz geht dabei von Studien an Menschen, die spezifische Pathophysiologien in Folge von Mutationen einzelner entwicklungsrelevanter Gene aufweisen, zurück zum Tiermodell, wo diese Mutationen nachgestellt und damit die Auswirkungen dieser Gene auf die Gehirnentwicklung analysiert werden können. So entsteht ein klarer werdendes Bild der Entstehung des Gehirns und einiger psychiatrischer Erkrankungen, was möglicherweise zu Ansätzen neuer Diagnosemethoden oder Therapien dieser Krankheiten führt. Im Folgenden soll auf den Mechanismus der Gehirnentstehung, speziell der Großhirnrinde eingegangen werden.

## 1.1 Die Embryonalentwicklung des Neokortex

Die Großhirnrinde der Säugetiere, der sog. Kortex oder Neokortex ist die zentralnervöse Integrationsstruktur aller sensorischen Reize des Körpers. Sie ist für die Verarbeitung der Sinneswahrnehmungen, die Steuerung kognitiver Prozesse sowie die Planung und Ausführung willkürlicher Bewegungen verantwortlich. Der Kortex kann makroanatomisch in vier Areale unterteilt werden: den Frontal-, Parietal-, Temporal- und Occipitalappen. Funktionell lässt sich der Kortex in Kolumnen aufteilen, was einer vertikalen Säule des Kortex entspricht, deren Zellen auf ähnliche Modalitäten eines Reizes, wie z.B. Farbe oder Form bei visuellen Reizen, antworten (Hubel and Wiesel, 1962).

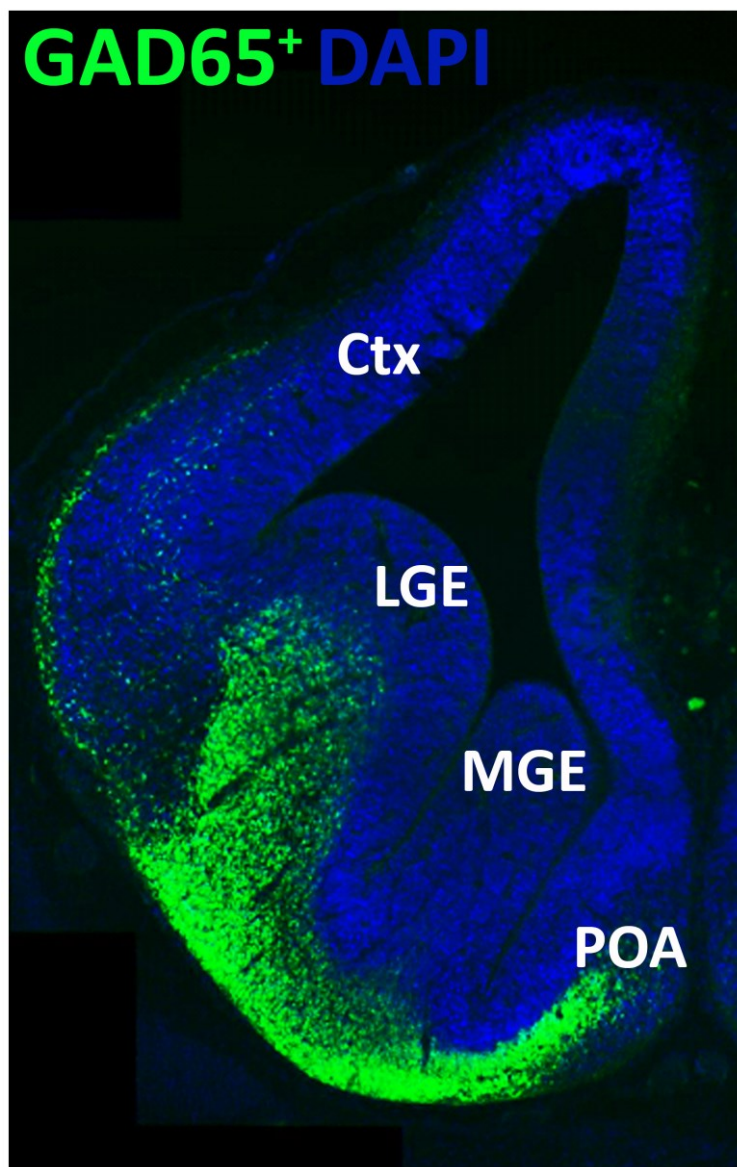
Mikroanatomisch ist der Kortex vertikal in 6 Zellschichten aufteilbar, die sich in Packungsdichte und Zellmorphologie unterscheiden. Aus dieser Architektur konnte Korbinian Brodmann 1909 verschiedene horizontale kortikale Areale unterscheiden, die, wie sich später herausstellte, auch funktionell abgegrenzt werden können und auch heute noch zur anatomischen Orientierung herangezogen werden. (Brodmann, 1909). Funktionell weisen die verschiedenen Schichten des Kortex ebenfalls Unterschiede auf, wie z.B. die Art des Neurotransmitters oder die spezifischen Verbindungen zu anderen Nervenzellen oder Effektorzellen. Beispielsweise bilden die Axone der Zellen aus Schicht 6 Kollaterale in Schicht 4, nicht aber in Lamina 5, wobei Neurone aus Schicht 2/3 Verbindungen in den Schichten 2/3 und 5, aber nicht in Lamina 4 und 6 ausprägen (Garey and Powell, 1971; Lund and Mustari, 1977). Des Weiteren enden in Schicht 4 die thalamischen Afferenzen, wohingegen die kortiko-thalamischen Verbindungen von Zellen der

Schicht 6 ausgehen. Die Verbindungen zu anderen kortikalen Arealen, beispielsweise über das *Corpus callosum* auf die andere Hemisphäre, werden von den Neuronen der Schicht 2/3 ausgesendet (Gilbert and Kelly, 1975; Bolz and Gilbert, 1986). Diese spezifischen Verbindungen sind entscheidend für die korrekte Ausbildung kortikaler Schaltkreise und somit für die Verarbeitung und die Reaktion auf sämtliche Eindrücke aus der Umwelt (Gilbert and Wiesel, 1979; Bolz and Gilbert, 1986, 1989; Katz and Callaway, 1992). Zusätzlich ist eine korrekte Konnektivität der Areale im Gehirn entscheidend für die fehlerfreie Funktion des Kortex. So konnten beispielsweise bei Patienten mit Schizophrenie fehlerhafte Verbindungen zwischen Hirnarealen beobachtet werden, die möglicherweise zur Pathophysiologie der Krankheit beitragen. (Meyer-Lindenberg, 2010) Allerdings ist die Konnektivität des Kortex sehr variabel und anpassungsfähig, wie das Beispiel der Reeler-Maus zeigt, deren vertikale kortikale Architektur auf Grund einer Mutation des Reelin-Gens zerstört ist, deren kortikale Verbindungen aber spezifisch geknüpft werden, so dass die Tiere kaum Verhaltensauffälligkeiten zeigen (Chung, 1976).

Die meisten Zellen des 6-schichtigen Kortex werden während der Entwicklung zwischen Embryonaltag E10,5 und E14,5 in der dem Ventrikel angrenzenden Schicht – der Ventrikularzone (VZ) – geboren und wandern entlang radialer Gliazellen distal aus. Dabei bestimmt der Zeitpunkt der Geburt eines Neurons dessen spätere Position im Gehirn. So bilden die zuerst geborenen Zellen die tiefer gelegenen Schichten 5 und 6; die spät geborenen Zellen hingegen die oberen Schichten 2/3 und 4, so dass eine Entwicklung von innen nach außen zu Stande kommt (Rakic, 1971, 1974; McConnell, 1988; Misson et al., 1991). Aus diesen radial migrierenden Vorläuferzellen entwickeln sich exzitatorische (erregende) - glutamaterge Projektionsneurone, die als charakteristische Pyramidenzellen erkennbar sind. Die GABAergen - inhibitorischen (hemmenden) Interneurone vollziehen dagegen eine tangential zur Oberfläche des Gehirns verlaufende Migration von ihrem Geburtsort in der Ventrikularzone des basalen Telencephalons in den sich entwickelnden Kortex (De Carlos et al., 1996a; Anderson et al., 2001; Marin and Rubenstein, 2001; Gorski et al., 2002).

## 1.2 Radiale und tangential Migration neuronaler Zellen des Kortex

Die exzitatorischen Projektionsneurone und die inhibitorischen Interneurone bilden die Grundlage aller Verarbeitungsprozesse des Gehirns. Dabei stellen die Interneurone allerdings nur ca. 20% der neuronalen Zellen des Kortex dar und zeichnen sich durch die Verwendung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA aus, wodurch sie hemmende postsynaptische Potentiale in nachgeschalteten Neuronen induzieren. Die Synthese des Neurotransmitters wird durch die Enzyme GAD65 und GAD67 gewährleistet. In Abb. 1 ist zu erkennen, dass das Enzym GAD65 in Neuronen des basalen Telencephalons exprimiert wird und diese Zellen tangential zur Hirnoberfläche in Richtung des entstehen-

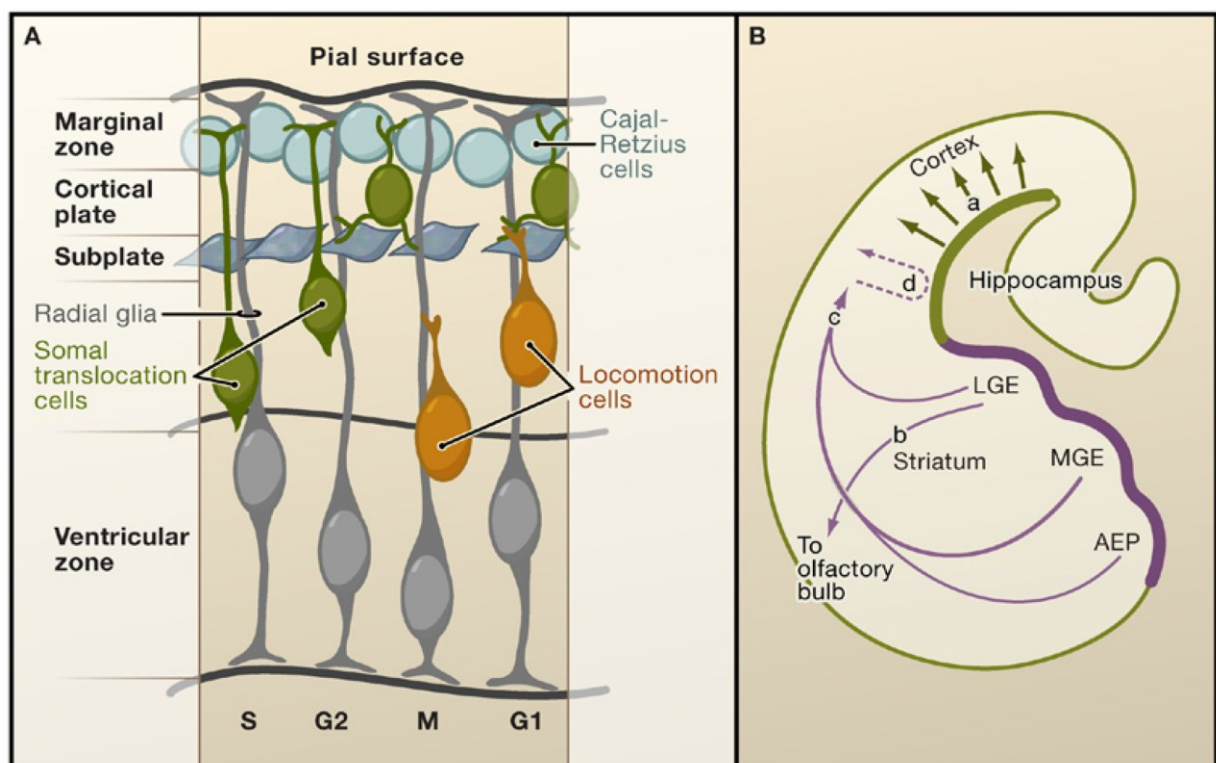


**Abb. 1** Coronaler Schnitt eines Gehirns einer GAD65-GFP transgenen Maus am Embryonaltag E14,5 nach Lehmann et al. 2012

In grün sind Zellen gefärbt, welche das GABA-synthetisierende Enzym GAD65 produzieren. Die Abbildung verdeutlicht, dass GABAerge Interneurone im basalen Telencephalon geboren werden und tangential in Richtung Kortex migrieren. Ctx: Kortex; LGE: Laterale ganglionische Eminenz; MGE: mediale ganglionische Eminenz; POA: präoptisches Areal, DAPI: Zellkernfärbung.

den Kortex', des Hippocampus', des Striatums und des olfaktorischen Bulbus' migrieren. (de Carlos et al., 1996b; Anderson et al., 1997; Wichterle et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marin and Rubenstein, 2001; Wichterle et al., 2001; Lehmann et al., 2012)

Projektionsneurone werden im Gegensatz zu Interneuronen im dorsalen Telencephalon geboren und wandern radial entlang von Gliazellen in den Kortex ein (Hatten, 1990). Während der Zellteilung vollziehen sie eine interkinetische nukleare Translokation, wobei das Soma dieser Zellen innerhalb der VZ je nach Phase des Zellzyklus' bewegt wird. So wird gewährleistet, dass sich ausschließlich die Zellen, welche sich in der M-Phase des Zellzyklus' befinden, direkt an der Oberfläche des Ventrikels liegen, während sie in den anderen Phasen (G1, G2 und S) in eher distalen Bereichen der VZ zu finden sind (Taverna and Huttner, 2010; Abb. 2A). Nachdem ein postmitotisches Neuron entstanden ist, kommt es zu einer multipolaren Phase, wo ein Kontakt mit der radialen Glia gesucht



**Abb. 2: Schematische Darstellung radialer und tangentialer Migration neuronaler Zellen nach Ayala et al. 2007**

**(A)**, Darstellung der radial migrierenden Zellen im entstehenden Kortex. Die Neurone werden in der VZ geboren und wandern radial entlang von Gliazellen nach einem „inside-out“-Prinzip in Richtung Pia aus. Die Vorläuferzellen vollziehen während des Zellzyklus' eine interkinetische nukleare Translokation, wobei sich das Soma in der M-Phase des Zellzyklus' am Ventrikel befindet, wohingegen es in den anderen Phasen (G1, G2 und S) im distalen Bereich der VZ zu finden ist. **(B)**, Schematische Darstellung eines coronalen Hirnschnitts während der Gehirnentwicklung. In grün sind radial migrierende Projektionsneurone dargestellt (a), in lila tangential migrierende Interneurone, die in verschiedenen Regionen des basalen Telencephalons entstehen. Diese wandern in Richtung Striatum, olfaktorischen Bulbus (b) oder den Kortex (c), wo sie radial in die Zielschicht einmigrieren (d). AEP: Area endopeduncularis = POA präoptisches Areal, MGE: mediale ganglionische Eminenz, LGE: laterale ganglionische Eminenz.

wird. An dieser migriert die Zelle entlang, bis es Stopp-Signale, wie z.B. Reelin, erhält, woraufhin das Neuron sich von der Glia löst und an dieser Position zu liegen kommt (Nadarajah and Parnavelas, 2002; Ayala et al., 2007; Abb. 2A).

Die tangentielle Migration hingegen stellt eine Zellwanderung über eine lange Distanz dar und verläuft wahrscheinlich nicht entlang von Gliazellen. Die Interneurone entstehen in verschiedenen Regionen des basalen Telencephalons in der medialen-, der lateralen-, der caudalen ganglionischen Eminenz sowie des präoptischen Areals und wandern auf distinkten Wegen in den Kortex ein (Abb. 2B). Abhängig vom Entwicklungsstadium unterliegt diese Wanderung dynamischen Veränderungen, da migrierende Interneurone am Embryonaltag E12,5 eine eher superfizielle Route einschlagen, wohingegen später geborene Interneurone des 13. Embryonaltages zusätzlich auf tiefer gelegenen Wegen migrieren (Anderson et al., 2001; Marin and Rubenstein, 2001).

Kortikale Interneurone können hinsichtlich ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften unterschieden werden. Zusätzlich werden einige Markergene zur Klassifikation der Interneurone herangezogen. Die Ausstattung der Interneurone mit spezifischen Genen wird wiederum von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *Dlx1/2*, *Lhx6*, *Nkx2.1* oder *Sip1*, reguliert, die sowohl die Identität der Interneurone als auch die korrekte Migration in Richtung Kortex sicherstellen. So können sog. „fate mapping“ Studien angestellt werden, welche die Herkunft spezifischer Interneurone ergründen. (Butt et al., 2005; Liodis et al., 2007; Butt et al., 2008; Du et al., 2008; Nobrega-Pereira et al., 2008; van den Berghe et al., 2013) Mit Hilfe spezifischer Markierungen raumzeitlicher Strukturen des basalen Telencephalons konnte in den letzten Jahren der Ursprungsort einer Vielzahl von Interneuronen aufgeklärt werden. So fand man heraus, dass beispielsweise schnell feuervernde („fast spiking“), PV<sup>+</sup> (Parvalbumin)-positive Korbzellen und SST<sup>+</sup> (Somatostatin)-exprimierende Chandelier-Zellen, welche meist schubweise feuern („burst spiking“), der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) entstammen; während die caudale ganglionische Eminenz (CGE) eher adaptiv feuervernde („adapting firing“) VIP/CR<sup>+</sup> (vasoaktives intestinales Protein/Calretinin)-positive Interneurone hervorbringt (Butt et al., 2005; Miyoshi et al., 2007). Unter führenden Neurowissenschaftlern herrscht allerdings immer noch keine absolute Klarheit über die Einteilung kortikaler Interneurone und es werden über 20 unterschiedliche Klassen von Interneuronen diskutiert (Ascoli et al., 2008; Defelipe et al., 2013).

Aus den verschiedenen physiologischen, morphologischen und genetischen Eigenschaften GABAerger Zellen entstehen komplexe inhibitorische Schaltkreise in der Groß-

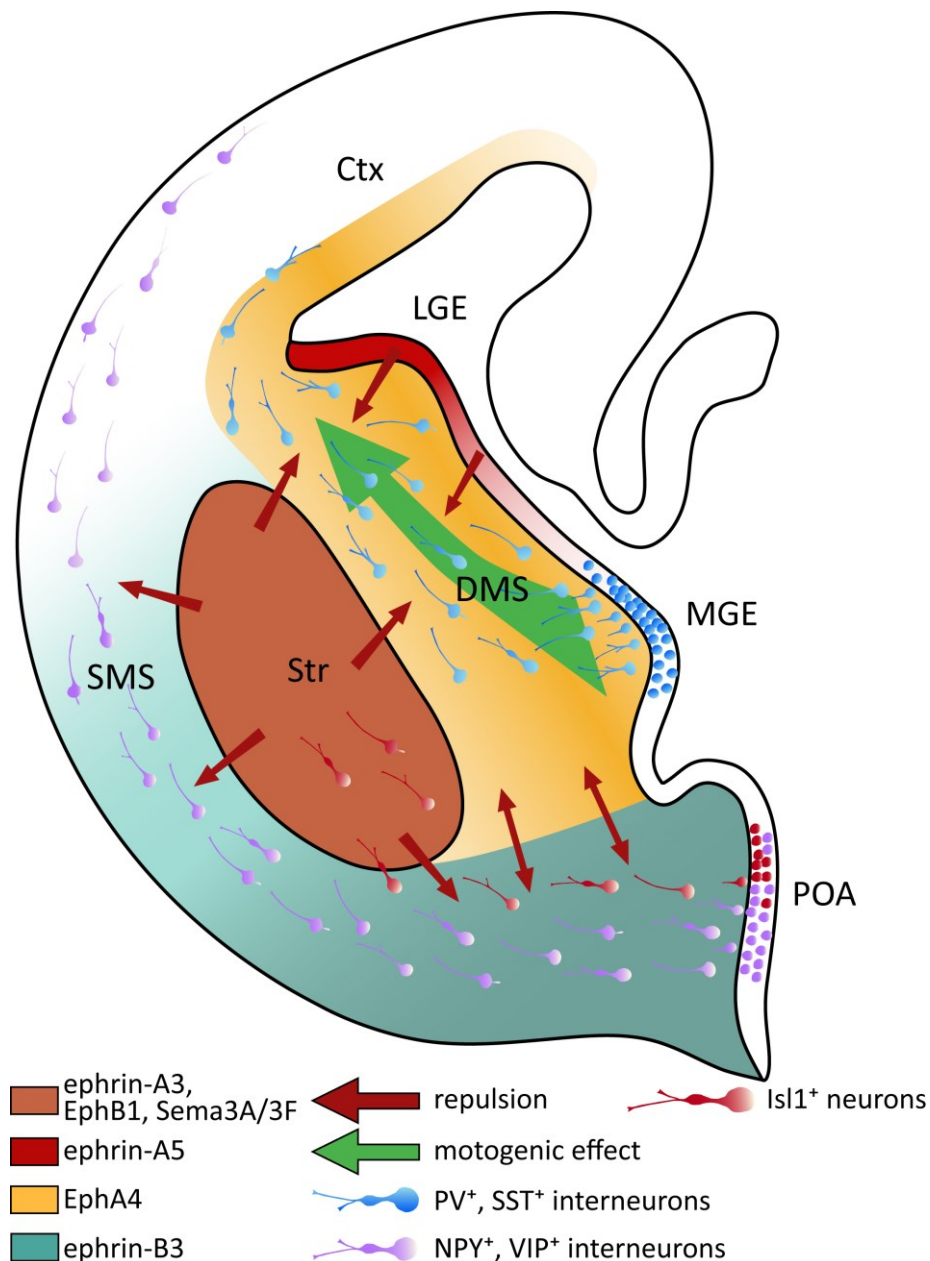


hirnrinde (Markram et al., 2004; Kilb, 2012; Le Magueresse and Monyer, 2013). Die Interneurone kontrollieren sowohl die Synchronisierung als auch den Informationsfluss im Gehirn. Dabei reguliert die dendritische Inhibition durch GABAerge Zellen die Effektivität und Plastizität des synaptischen Eingangs der Pyramidenzellen, wobei die perisomatische Hemmung den Ausgang und die Synchronisation der Projektionsneurone kontrolliert (Freund, 2003). Während der frühen Onthogenese ist die Reifung lokaler inhibitorischer Schaltkreise entscheidend für die kortikale Plastizität und somit für Lern- und Gedächtnisprozesse (Hensch, 2005). Des Weiteren können Verschiebungen der Balance von Erregung und Hemmung im Gehirn, so genannte Interneuropathien, zu neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Schizophrenie, Epilepsie, Depressionen oder Autismus, führen (Sanacora et al., 2000; Levitt, 2005a). Interneuropathien können z.B. auf Grund von Proliferations- und Migrationsdefiziten oder auch durch fehlerhafte Apoptose bei der Entwicklung der Interneurone zu Stande kommen. Die Aufklärung von Entwicklungsprozessen kortikaler Interneurone ist somit entscheidend für das Verständnis dieser Erkrankungen des Gehirns.

### **1.3 Interneurone werden mit Hilfe von Lenkungsmolekülen in den Kortex geleitet**

Auf dem Weg in den sich entwickelnden Kortex folgen die Interneurone bestimmten Routen, welche durch Lenkungsmoleküle verschiedener Molekülfamilien, wie Semaphorinen, Slits oder Ephrinen vorgegeben werden. Diese Moleküle wirken attraktiv oder repulsiv auf migrierende Interneurone und liegen sowohl zellgebunden als auch sezerniert im extrazellulären Milieu vor. Es können graduelle sowie scharf begrenzte Expressionen solcher Faktoren beobachtet werden, welche den Interneuronen Zielregionen bzw. Nichtzielregionen vorgeben. (Marin and Rubenstein, 2003; Lehmann et al., 2012) So stellen beispielsweise die Neureguline attraktive Substanzen für Interneurone dar, die sowohl sezerniert als auch zellgebunden vorliegen können und ihre Wirkung über den ErbB4-Rezeptor auf den Zellen vermitteln (Flames et al., 2004). Den Faktoren BDNF („brain derived neurotrophic factor“) und HGF/SF („hepatocyte growth factor/ scatter factor“) wurde ebenfalls eine attraktive Wirkung auf Interneurone zugeschrieben (Powell et al., 2001; Polleux et al., 2002). Allerdings weisen die meisten beschriebenen Interaktionen zwischen Interneuronen und Lenkungsmolekülen repulsiven Charakter auf, wie z.B. zwischen Slits und ROBO-Rezeptoren, den Semaphorinen mit Neuropilin-

Rezeptoren oder auch den Ephrinen und den Eph-Rezeptoren (Hu, 1999; Marin et al., 2001; Rudolph et al., 2009; Zimmer et al., 2011). In Abb. 3 sind einige Interaktionen der Interneurone des basalen Telencephalon mit Lenkungsmolekülen zusammengefasst. So ist beispielsweise Sema3A/3F im Striatum exprimiert und stellt somit für kortikale In-



**Abb. 3 Schematische Darstellung einiger Lenkungsmoleküle für Interneurone des basalen Telencephalon nach Lehmann et al. 2012**

Vertreter des Semaphorin- und Eph/Ephrin-Systems agieren gemeinsam um migrierende Interneurone zu ihren Zielregionen zu leiten. Die MGE bringt am Embryonaltag E14,5 gehäuft PV<sup>+</sup> und SST<sup>+</sup> Interneurone hervor, die bevorzugt auf dem DMS (tiefen Migrationsstrom) wandern und durch EphA/Ephrin-A-Signale geleitet sowie motogen aktiviert werden. In der POA entstehen zu diesem Entwicklungszeitpunkt sowohl NPY<sup>+</sup> (Neuropeptid Y) und VIP<sup>+</sup> als auch Islet-1<sup>+</sup> Interneurone, welche vorrangig den SMS (superfiziellen Migrationsstrom) bilden und durch EphB/Ephrin-B-Interaktionen geleitet werden. Zusätzlich werden Islet-1<sup>+</sup> striatale Interneurone in ihrer Zielregion durch EphB/Ephrin-B-Interaktionen gebremst.

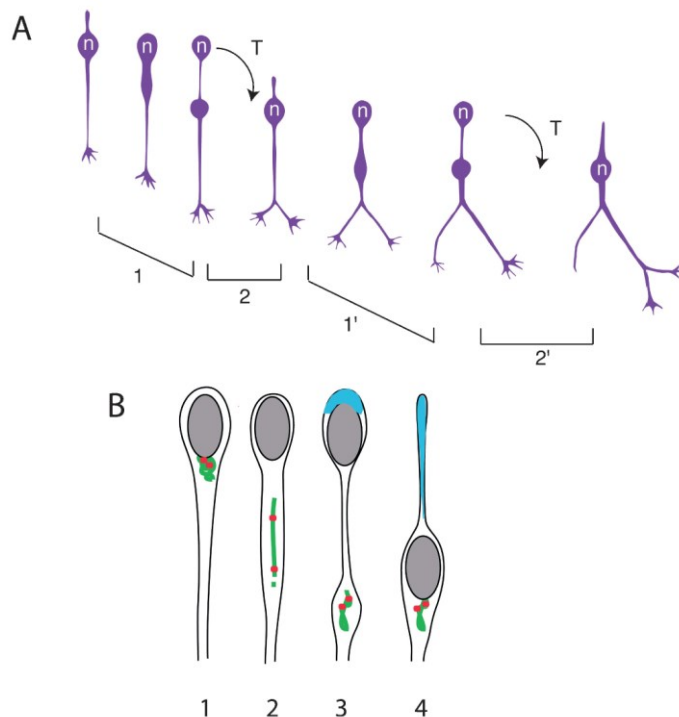
terneurone, welche einen Neuropilin-1-Rezeptor tragen, eine Migrationsbarriere darstellen (Marin et al., 2001). Des Weiteren wurden in den letzten Jahren verschiedene Funktionen des Eph/Ephrin-Systems bei der interneuronalen Migration beschrieben. Zum einen sorgt eine Expression von zellgebundenem Ephrin-A3 im Striatum bzw. Ephrin-A5 in der VZ dafür, dass EphA4 exprimierende Interneurone diese Strukturen passieren; zum anderen segregiert eine gegenseitige Eph/Ephrin-Interaktion zwischen Interneuronen aus der POA und der MGE die Ströme dieser beiden Zellpopulationen. Zusätzlich zu attraktiven und repulsiven Wirkungen konnten aktuelle Studien belegen, dass Eph/Ephrin-Interaktionen außerdem migrationsfördernde, aber auch bremsende Funktionen auf Interneurone haben. So werden GABAerge Zellen aus der MGE auf ihrem Weg durch spezifische EphA/Ephrin-A-Signale motogen aktiviert und striatale Interneurone durch Ephrin-B-Interaktionen in ihrer Zielregion gebremst. (Zimmer et al., 2008; Zimmer et al., 2011; Lehmann et al., 2012; Rudolph et al., 2013; Steinecke, 2013; Abb. 3) Der Migrationsmodus kortikaler Interneurone selbst ist ein komplexer Prozess, welcher im Folgenden näher beleuchtet werden soll.

## 1.4 Der Migrationsmodus kortikaler Interneurone

Postmitotische GABAerge Interneurone vollziehen eine saltatorische Bewegung während der gesamten Migration zu ihrer finalen Position im Kortex. Nach dem Abschluss der Zellteilung im basalen Telencephalon entsteht ein polarisiertes Interneuron mit einem nach vorn gerichteten sog. „leading process“ (Führungsfortsatz) und dem nachfolgenden Soma mit dem Zellkern. Diese Polarität wird durch Zytoskelettkomponenten, wie dem Zentrosom, realisiert, von wo aus die meisten Mikrotubuli der Zelle ausgehen, die sowohl in Richtung Zellkern polymerisieren, was in Folge dessen den hinteren Zellpol darstellt, als auch in die entgegengesetzte Richtung, was daraufhin den vorderen Pol bildet (Li and Gundersen, 2008).

Der vordere Zellpol migrierender Interneurone bildet den Führungsfortsatz, welcher meist bifurkal verzweigt vorliegt und auf umgebende Lenkungsfaktoren reagieren kann. So konnte gezeigt werden, dass ein solcher Fortsatz den Ast, welcher einer repulsiven Substanz zugewandt ist, einzieht und die Zelle daraufhin in die Richtung migriert, welche der Quelle des repulsiven Signals abgewandt ist (Martini et al., 2009). Vor dem Soma mit dem Zellkern bildet sich häufig eine Schwellung, in welche der Kern sprungartig hineinbewegt wird, nachdem eine Richtungsentscheidung der Zelle getroffen ist. Die Trans-

lokation des Kerns ist abhängig von Zytoskelettkomponenten, welche den Kern entweder durch Kontraktionen von MyosinII an Aktinfasern nach vorn schieben oder welcher



**Abb. 4: Schematische Darstellung der saltatorischen Bewegung kortikaler Interneurone nach Metin et al. 2006**

**(A)**, Vor dem Soma mit dem Zellkern eines migrierenden Interneurons entsteht eine Schwellung und der Führungsfortsatz verzweigt sich meist bifurkal (1). Der Zellkern (n) bewegt sich sprunghaft in die Schwellung, was man als somale Translokation bezeichnet, wobei ein Ast des Führungsfortsatzes eingezogen wird (2) und der Zyklus beginnt erneut (1', 2'). **(B)**, Die saltatorische Bewegung der Zellen geht mit Veränderungen subzellulärer Strukturen einher. So kommt es zu einer Verlängerung des Golgi-Apparates (grün) und das Zentrosom wird nach vorn verlagert (rot). Des Weiteren vollziehen sich am hinteren Ende MyosinII-Akkumulationen (blau), welche zur Zellkernbewegung beitragen, wo sich nach erfolgter Translokation oftmals ein sog. „trailing process“ (hängender Fortsatz) bildet.

mit Hilfe von Motorproteinen entlang von Mikrotubuli nach vorn gezogen wird. (Bellion et al., 2005; Tsai and Gleeson, 2005; Metin et al., 2006) Des Weiteren müssen Adhäsions- und Deadhäsionsprozesse stattfinden, wobei die Zelle am hinteren Ende vom Substrat gelöst wird und am Vorderende neue Adhäsionspunkte entstehen (Schaar and McConnell, 2005; Abb. 4).

Die neuronale Migration stellt einen wichtigen entwicklungsbiologischen Schritt dar, um Nervenzellen unterschiedlicher Funktion und Herkunft im Kortex zu vereinen und die Bildung neuronaler Schaltkreise zu sichern. Bei einigen Krankheitsbildern konnten Mutationen in Genen gefunden werden, die für die korrekte Migration neuronaler Zellen verantwortlich sind, wie z.B. Lissencephalie-1 (Lis1), DAB1, Reelin, Double-cortex oder Doublecortin. So führt die Mutation eines Lis1-Allels zu einer dramatischen Veränderung des Kortex, was mit massiven geistigen Einschränkungen der Erkrankten einhergeht. Der Kortex dieser Patienten ist 4-schichtig und wenig gyrifiziert, was höchstwahrscheinlich auf einen Migrationsdefekt oder eine geringe Schichtspezifizierung exzitatorischer Neurone zurückzuführen ist, wie sie im Mausmodell für Lis1-Mutationen zu beobachten sind. (Gleeson, 2000) Eine Mutation des Lis1-Gens führt ebenfalls zu einem Migrationsdefekt GABAerger Interneurone, was eine Rolle dieses Gens bei der zellautonomen tangentialen Migration suggeriert (McManus et al., 2004). In neueren Arbeiten

konnte gezeigt werden, dass Lis1 für die nukleare Translokation des Zellkerns sowie des Zentrosoms neuronaler Zellen verantwortlich ist. Dieses Protein ist an der Kopplung des Zellkerns an Dyneinkomponenten beteiligt, was für die Vorwärtsbewegung des Zellkerns notwendig ist (Tsai et al., 2007; Huang et al., 2012).

Am Beispiel von Lis1 konnte gezeigt werden, dass gravierende geistige Leistungseinbußen aufgrund fehlerhafter neuronaler Migration zu Stande kommen können. Ein anderes Beispiel für ein Gen, welches im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen steht und Einfluss auf Migrationsprozesse von Projektionsneuronen hat ist „Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1).

## 1.5 DISC1 stellt ein Risikogen für Schizophrenie dar

Schizophrenie ist eine mentale Erkrankung, von der 1% der Bevölkerung betroffen ist. Die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken steigt mit dem Grad der Verwandtschaft zu einem bereits Erkrankten, so beträgt diese bei eineiigen Zwillingen 50%. Dies zeigt allerdings auch, dass die Krankheit nicht ausschließlich auf genetischen Ursachen beruht und es konnte bewiesen werden, dass pränatale Infektionen oder frühkindlicher Stress die Prävalenz eines Ausbruchs von Schizophrenie erhöhen. Die Betroffenen leiden zum einen unter Positivsymptomen, wie z.B. Halluzinationen, Hyperaktivität oder unlogische Sprech- und Denkweise. Zum anderen kommt es bei Schizophreniepatienten zu Negativsymptomen, wie Apathie, sozialer Zurückgezogenheit sowie Lern- und Gedächtnisdefiziten. So haben Patienten mit Schizophrenie oft große Schwierigkeiten Aufgaben, die das Kurzzeitgedächtnis benötigen, zu lösen, welche auf die korrekte Funktion des dorso-lateralen-präfrontalen-Kortex (DLPK) zurückgeht und die Grundlage weiterer kognitiver Prozesse darstellt (Kandel, 2012)

Neben anderen neuronalen Systemen, welche mit der Pathophysiologie von Schizophrenie in Verbindung gebracht werden, wie dem dopaminergen System, wo die meisten Medikationen gegen die Positivsymptome ansetzen, oder dem glutamatergen System, stellt das inhibitorische GABAerge Netzwerk einen neuen Ansatz zur Beschreibung dieser Krankheit dar (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2012). So konnte im DLPK postmortaler Gehirne von Schizophreniepatienten eine verringerte Expression des GABA-synthetisierenden Enzyms GAD67 sowie des interneuronenspezifischen Gens Parvalbumin beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass eine Störung dieses Systems in dem Bereich des Gehirns vorliegt (Akbarian et al., 1995). Dies wiederum könnte die Ur-

sache einer gestörten Synchronisation der Aktivität pyramidalen Neurone und somit einer gestörten  $\gamma$ -Oszillation sein, wie sie bei Schizophrenikern zu beobachten ist und was Defizite des Kurzzeitgedächtnisses zur Folge haben könnte. (Lewis et al., 2005; Uhlhaas and Singer, 2010)

Eine verringerte Expression interneuronenspezifischer Gene könnte einerseits auf genetische Regulationsmechanismen innerhalb dieser Zellen zurückzuführen sein. Zum anderen könnte eine verringerte Anzahl dieser Zellen im DLPK, beispielsweise auf Grund eines Migrationsdefektes kortikaler Interneurone, ähnliche Auswirkungen haben. So konnte bei Schizophrenikern eine ektopische Ansammlung kortikaler Interneurone in der weißen Substanz, den Faserverläufen neuronaler Zellen, beobachtet werden, was auf einen solchen Migrationsdefekt schließen lässt (Anderson et al., 1996; Eastwood and Harrison, 2003; Joshi et al., 2012).

Das Gen DISC1 wurde bei Mitgliedern einer schottischen Familie identifiziert, welche eine chromosomale Translokation aufwiesen, auf Grund derer es zu einem Abbruch dieses Gens kommt. Diese Genveränderung wurde mit mentalen Erkrankungen, wie Depression oder Schizophrenie assoziiert, da viele Mitglieder dieser Familie unter diesen Krankheiten litten. (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001) Anschließend fanden Studien heraus, dass DISC1 Einfluss auf die Anatomie und die Funktionsweise des Gehirns hat. So erkannte man, dass ein DISC1-Polymorphismus beispielsweise zu einem verringerten Volumen bzw. einer verringerten Integrität der weißen Substanz führt und diese Patienten eine geringere Kortexdicke aufwiesen, was mit elektrophysiologischen Veränderungen einherging. (Narayan et al., 2013)

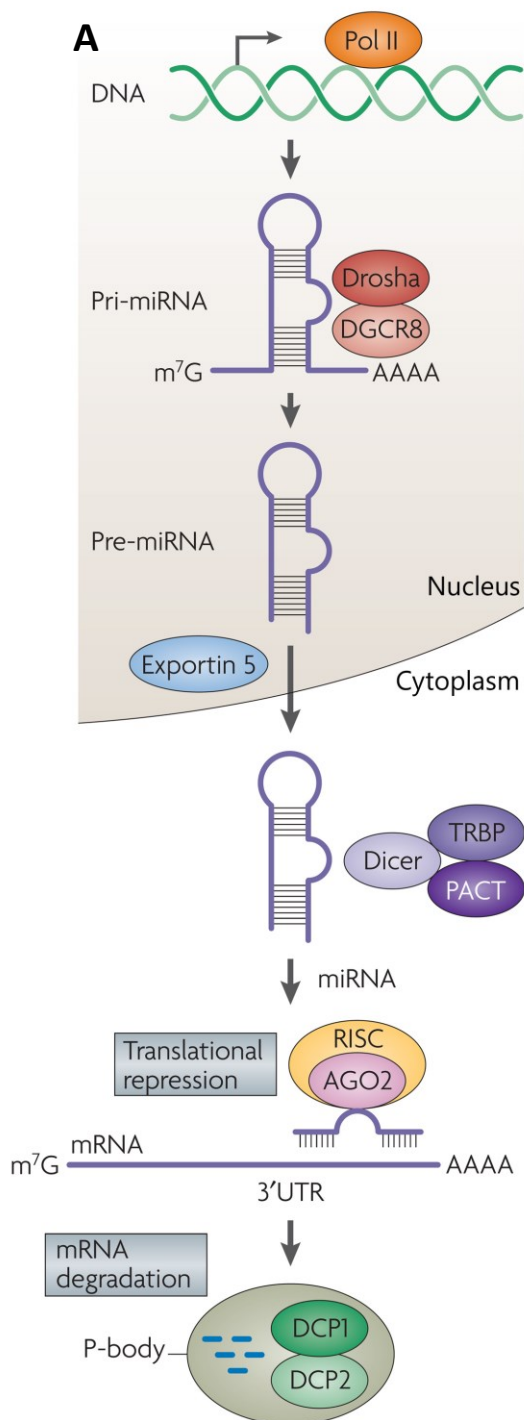
Unter biochemischen Gesichtspunkten stellt DISC1 ein Bindeprotein dar, was im Zytoplasma mit vielen verschiedenen Proteinen, wie z.B. Lis1, BBS („bardet biedl syndrome“) oder NDEL1 (nuclear disrupted element 1) interagiert. Untersuchungen zu DISC1 ergaben, dass eine korrekte DISC1-Expression für Migrationsprozesse von radial migrierenden Projektionsneuronen sowie hippocampalen Neuronen entscheidend ist (Tsai et al., 2007; Enomoto et al., 2009; Young-Pearse et al., 2010). Zusätzlich ist die Interaktion von DISC1 mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen für das Auswachsen von Neuriten entscheidend, was ein Indiz dafür ist, dass die Bildung neuronaler Schaltkreise bei einer Mutation von DISC1 gestört ist (Miyoshi et al., 2003; Kamiya et al., 2005). Ein weiterer Befund zeigte, dass DISC1 mit GSK3 $\beta$  interagiert, welches über den Wnt-Signalweg die korrekte Proliferation kortikaler Vorläuferzellen reguliert (Mao et al., 2009). Eine Studie

von Ishizuka et al. 2011 konnte beobachten, dass eine Phosphorylierungsstelle am DISC1-Protein einen Schalter zwischen der proliferationsregulierenden und der migrationsregulierenden Rolle dieses Faktors darstellt (Ishizuka et al., 2011).

Die Expression von DISC1 kann über extrazelluläre Mechanismen gesteuert werden, z.B. erhöhen Neuregulin-1 und -2 die Expression von DISC1 durch Interaktion mit ErbB2- und -3-Rezeptoren über den PI3/Akt-Signalweg (Seshadri et al., 2010). Im Gegensatz dazu verringert eine Injektion von NMDA-Rezeptorantagonisten in hippocampale Strukturen die Expression von DISC1 und führt zu einer Fehlpositionierung neugeborener Granulazellen (Namba et al., 2011).

Mit den Experimenten der vorliegenden Dissertation soll die Rolle von DISC1 während der tangentialen Migration kortikaler Interneurone untersucht werden und damit eine mögliche Ursache des gestörten GABAergen Systems bei der Pathophysiologie von Schizophrenie beleuchtet werden. Dabei soll die Expression von DISC1 während der Entwicklung des Gehirns, speziell der GABAergen Interneurone beobachtet werden und die Funktion dieses Gens in migrierenden Interneuronen herausgearbeitet werden. Hierfür soll die Methode der RNA-Interferenz zum Einsatz kommen, welche es ermöglicht die Genexpression spezifisch zu verringern. Dieser Mechanismus beruht auf der Tatsache, dass doppelsträngige RNA im Zellsoma eukaryotischer Zellen abgebaut wird, woraufhin auch einzelsträngige RNA, welche sequenzhomolog zur doppelsträngigen RNA ist, durch einen komplexen Prozess degradiert wird. Dies wird von eukaryotischen Zellen zur Regulation der Expression spezifischer Gene genutzt und so konnten intrinsische miRNA (mikro RNA) beschrieben werden, die eine ganze Reihe von Genen auf der Ebene der RNA regulieren können. (Kim and Rossi, 2007; Abb. 5A) Wird nun die Zelle mit einem Plasmid transfiziert, welches für spezifische miRNA kodiert, die homolog zur mRNA eines Zielgens ist, so wird die Translation dieses Gens gestoppt sowie die mRNA von der Zelle abgebaut und es kommt somit zur Herunterregulation des Gens. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine miRNA zur Herunterregulierung von DISC1 in migrierenden Interneuronen zu exprimieren und die Auswirkungen in verschiedenen *in vitro* Experimenten zu beobachten. Des Weiteren soll versucht werden mögliche Ergebnisse im lebenden Organismus zu reproduzieren. Hierfür steht die intrauterine Operation zur Verfügung, wobei Strukturen des Gehirns eines lebenden Embryos mit Plasmid-Konstrukten transfiziert werden können. (Taniguchi et al., 2012); Abb. 5B) Der Mechanismus der RNA-Interferenz in Kombination mit der intrauterinen Operation zur Transfektion des Zielgewebes lässt es zu spezifische Gene an bestimmten Zeitpunkten der

Entwicklung in räumlich begrenzten Regionen eines lebenden Embryos herunterzuregulieren. Somit kann die Expression des Risikogens für Schizophrenie, DISC1, während der Entwicklung in kortikalen Interneuronen herabgesetzt werden und die Funktion dieses Gens bei der tangentialen Migration GABAerger Zellen im lebenden Organismus beobachtet werden.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz nach Kim et al. 2007 und deren Verwendung bei der intrauterinen Operation nach Tanigushi et al. 2012**

**(A)**, Der intrinsische Mechanismus der RNA-Interferenz erfolgt (1) durch die Expression der spezifischen miRNA im Kern, die Prozessierung durch den Drosha/DGCR8-Komplex und die Überführung ins Zytoplasma über Exportin-5. (2) Die miRNA wird durch den Dicer-TRBP-PACT-Komplex weiter prozessiert, woraufhin die miRNA an Argonautenprotein-2 (AGO2) und RNA-induzierten Stilllegungskomplex (RISC) bindet. (3) Die miRNA erkennt komplementäre mRNA, woraufhin die Translation gestoppt wird und die mRNA danach in sog. „processing-bodies“ (p-bodies) degeneriert wird. Bei einer Transfektion eukaryotischer Zellen mit einem Expressionskonstrukt für spezifische miRNA wird der beschriebene Mechanismus genutzt um die Translation des Zielgens zu unterbinden. **(B)**, Bei der intrauterinen Operation werden die Uterushörner einer anästhesierten schwangeren Maus freigelegt und die Transfektionslösung mit Hilfe einer Glaskapillare durch die Uteruswand in die Ventrikel der Embryonen injiziert. Es folgt die Elektroporation mittels Zangenelektrode. Nach Beendigung der Elektroporation wird der Bauchraum der Maus verschlossen und die Maus erweckt.

Bei mentalen Erkrankungen des Schizophreniespektrums handelt es sich um multifaktoriale Störungen, welche vielfältige genetische als auch umweltbedingte Ursachen ha-



ben können. Somit reicht es nicht aus die Rolle eines einzelnen Gens zu betrachten um ein vollständiges Verständnis dieser Krankheiten zu erhalten. Es ist allerdings von großer Bedeutung die Funktionen von Risikogenen für Schizophrenie herauszuarbeiten, um auf deren Grundlage die komplexe Pathophysiologie dieser Erkrankungen erklären zu können.

## 2 Zielstellung

„Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1) stellt ein Risikogen für Schizophrenie dar. So erhöht eine Mutation dieses Gens die Wahrscheinlichkeit Symptome des Schizophreniespektrums, wie z.B. bipolare Störungen, Depressionen oder Schizophrenie, auszubilden. (Blackwood et al., 2001) Da die Ursachen dieser psychiatrischen Erkrankungen multikausal sind, ist deren Beschreibung sehr komplex. Allerdings ist es möglich die Funktionen einzelner Risikogene zu untersuchen und deren Beitrag zur korrekten Funktionsweise des Organismus, speziell des Gehirns herauszustellen.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Rolle des Gens DISC1 während der Entwicklung kortikaler Interneurone der Maus zu untersuchen. GABAerge Interneurone stellen ca. 1/5 der neuronalen Zellen von Säugetieren dar und führen zu inhibitorischen postsynaptischen Potentialen an nachgeschalteten Neuronen. Eine korrekte Balance zwischen Inhibition und Exzitation ist für die fehlerfreie Funktionsweise des Gehirns entscheidend, und so wurde bei einigen psychiatrischen Erkrankungen, wie Autismus, Epilepsie oder Schizophrenie, eine Änderung dieser Balance beobachtet (Levitt, 2005b). Kortikale Interneurone migrieren während der Entwicklung von ihrem Entstehungsort im basalen Telencephalon tangential in Richtung Kortex, wobei eine fehlerfreie Migration die korrekte Anzahl und Komposition dieser Zellen im adulten Organismus sicherstellt. So soll in dieser Dissertation untersucht werden, ob:

1. DISC1 während der Migration kortikaler Interneurone in diesen Vorläuferzellen GABAerger Interneurone exprimiert ist.
2. Die Migration dieser neuronalen Zellen durch einen DISC1-Defizit bzw. eine DISC1-Überexpression beeinflusst wird und wie sich dies auf die saltatorische Bewegung dieser Zellen auswirkt.
3. DISC1 Einfluss auf Zytoskelettkomponenten nimmt, welche für die korrekte Migration dieser Zellen entscheidend sind.
4. Eine korrekte DISC1-Expression in Interneuronen lebender Organismen für die Migration dieser Zellen während der Entwicklung notwendig ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Agarose	Roth
Agarose ("low melt")	Roth
B27 Supplement	Gibco
BSA	Serva
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma-Aldrich
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco
DNA-Standard	Fermentas
DNA-Ladepuffer	Fermentas
dNTPs	Amersham
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Esel-Normalserum	Jackson Immuno Research
Ethanol	Merck
Essigsäure	Roth
Fast green	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FBS)	Gibco
Geneticin	Invitrogen
D(+)-Glukose	Merck
L-Glutamin	Merck
Glycerol	Sigma-Aldrich
HBSS (Hank's Balanced Solution)	Gibco
HEPES	Roth
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck

Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Laminin	Sigma-Aldrich
Lipofectamine™2000	Invitrogen
Magnesium-Dichlorid-Hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck
Methylcellulose	Sigma-Aldrich
MEM (Minimum Essential Medium)	Gibco
Mowiol	Hoechst
N2 Supplement	Gibco
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Roth
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Roth
Natriumphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Neurobasalmedium	Gibco
n-Propylgallat	Sigma-Aldrich
Opti-MEM	Invitrogen
Paraformaldehyd [PFA, $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ]	Merck
Penicilli/Streptomycin	Gibco
Phalloidin	Biotium
Plasma vom Huhn	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
RNase-away®	Roth
Primer	Eurofins
Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ )	Roth
Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	Roth
Sucrose	Sigma-Aldrich
Thimerosal	Sigma-Aldrich
Thrombin	Sigma-Aldrich
Tissue Taq	Jung
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Roth

Trizol®	Invitrogen
Trypsin	Sigma-Aldrich
Ziegen-Normalserum	Gibco

### 3.2 Geräte und Materialien

2 Photonen konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM-510 in Kombination mit einer Brutkammer	Zeiss
Agarosegeldokumentation	MWG Biotech
Axioskop S-100	Zeiss
Brutschrank "HERA cell"	Heraeus
BTX Elektroporator	Harvard Apparatus
Deckgläser	Menzel Gläser
Gelelektrophoresevorrichtung	Gibco
Gewebehacker (Tissue Chopper®)	The Mickle Laboratory Engineering
Glaskapillaren 1,5 mm OD x 0,86 mm ID	Harvard Apparatus
Heizblock	Eppendorf
Heizdecke	Beurer
Hot-bead-Sterilisator	Fine science tools
Injektionsspritzen	Braun
Kryostat	Leica
Laminarbox "HERA safe"	Heraeus
Maschennetz	Schütt
MS2 Minischüttler	Schütt Labortechnik
Nanophotometer	Implen
Nähseide	Vicryl
Pipettensätze	Brand/Gilson
Petripermmembranen	Satorius
Petrischalen	Nunc
pH-Meter	Knick
Platinelektrode quadratisch 0,5 cm	Havard Apparatus
Platinelektrode in Petrischale	Havard Apparatus

Präparierbesteck	Roth
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttler	Edmund Bühler
SPOT Kamera	Visitron Systems
Sterilfilter 520 A	Schleicher und Schuell
Stereomikroskop "SV6"	Zeiss
Thermocycler	Eppendorf
Thomakammer	Assistent
Vibratom	Tech. Products international
Membranen	Whatman
Zangenelektrode 3 mm	Havard Apparatus
Zentrifuge 5804R und 5415C	Eppendorf

### 3.3 Enzyme und dazugehörige Puffer

DNaseI + Puffer	Fermentas
Reverse Transkriptase + Puffer	Fermentas
Hot Start Taq DNA Polymerase + Puffer	Qiagen

### 3.4 Antikörper

Esel anti Ziege DyLight <sup>488</sup> 1:500	Jackson Immuno Research
Esel anti Ziege Cy3 1:1000	Jackson Immuno Research
Esel anti Hase Cy3 1:1000	Jackson Immuno Research
Hase anti GFP 1:1000	Invitrogen
Hase anti Calbindin 1:1000	Swant
Hase anti pGirdin 1:50	IBL
Hase anti Lhx6 1:100	Santa Cruz
Hase anti pAkt 1:500	Invitrogen
Maus anti Aktin 1:50	Hybridoma Bank
Ziege anti Hase Cy2 1:200	Jackson Immuno Research
Ziege anti Hase Cy3 1:2000	Jackson Immuno Research

Ziege anti DISC1 1:50	Santa Cruz
Ziege anti GFP 1:400	Rockland
Ziege anti Maus Texas Red 1:100	Vector

### 3.5 Rezepturen, Puffer und Medien

Die Lagerung der Lösungen erfolgte, wenn nicht anders vom Hersteller vorgeschrieben, bei 4 °C und wurde mittels Sterilfilter (Porengröße 0,2µm) filtriert, wenn der Produzent sie nicht als steril deklarierte.

10x PBS („Phosphate Buffered Saline“): Von einer Lösung aus 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Aqua bidest. wurde der pH-Wert ermittelt und mittels Zugabe von 0,1 M NaOH bzw. 0,1 M HCl auf 7,4 eingestellt und autoklaviert. 1x PBS wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit A. bidest. hergestellt.

1x Krebspuffer: Von einer Lösung aus 126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2,1 mM CaCl<sub>2</sub> in A. bidest wird der pH-Wert auf 7,4 durch Zugabe von NaOH oder HCl eingestellt.

10 %-iges Chloralhydrat: 5 g Chloralhydrat wurden in 50 ml PBS gelöst und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

65 %-ige Glucose-Stammlösung: 32,5 g D-Glucose wurden in 50 ml A. bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

DEPC-Wasser: 1 ml DEPC wurde in einem 1 l A. bidest. unter Rühren gelöst.

GBSS: Zur Herstellung von GBSS wurden 1,53 mM CaCl<sub>2</sub>, 3,66 mM KCl, 0,22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,03 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,28 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 137,93 mM NaCl, 2,70 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,84 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 5,56 mM Glukose in A. bidest gelöst und sterilfiltriert.

Laminin und Poly-L-Lysin in GBSS: Die Deckgläschen für die Einzelzellkulturen wurden mit einer Laminin und Poly-L-Lysin-Lösung in GBSS beschichtet. Hierzu wurden jeweils 19,5 µg/ml Laminin und 5 µg/ml Poly-L-Lysin in GBSS gelöst.

Medium für primäre kortikale Einzelzellen: Zu 90 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden 150 µl 65%-ige D-Glukose, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml fötales Kälberserum hinzugefügt.

Mowiol Einbettmedium: Unter Rühren wurden 25 % Mowiol in PBS über Nacht gelöst. Danach wurden 50 % Glycerol zugegeben und erneut über Nacht gerührt. Der pH-Wert wurde auf 8,0 bis 8,5 eingestellt, 0,02 % Thimerosal zugegeben und die Lösung auf 50 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden 17,5 % n-Propylgallat unter Rühren gelöst. Das Mowiol wurde bei 4000 U/min für 15 min zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

MZ-Medium für Explantatkulturen: In DMEM wurden unter Rühren 0,4 % Methylzellulose bei 4 °C gelöst. Danach erfolgten die Zugabe von 0,1 % D-Glukose, 2,9 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % fötales Kälberserums und eine Sterilfiltration.

Neurobasalmedium für Schnitt-, Einzelzell- und Explantatkulturen: In 47 ml Neurobasalmedium wurden 1 ml B27 Supplement, 0,5 ml N2 Supplement, 0,5 ml 65%-ige D-Glukose, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin und 0,5 ml L-Glutamin gelöst und bei 4° C gelagert.

0,25%-iges Trypsin: Eine 2,5%-ige Trypsinlösung wurde 10-fach mit PBS verdünnt.

4 % PFA/PBS: Unter ständigem Rühren wurden 4 % Paraformaldehyd in PBS bei 58 °C gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Präpariermedium: 0,99 g D-Glukose und 1,05 g NaHCO<sub>3</sub> werden vor der Präparation primären Hirngewebes in 1x Krebspuffer gelöst und sterilfiltriert.

„post holding buffer“ Puffer zum Aufbewahren lebender embryonaler Hirnschnitte: Zu 49 ml Krebspuffer werden 0,5 ml 1 M HEPES, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin und 0,1



ml Gentamycin gegeben, um lebende Vibratonschnitte bis zum Auflegen auf Whatman-Membranen zu lagern.

0,9%-ige Salinelösung: 0,9% NaCl werden in A. dest gelöst und vor Verwendung auf 37° C erwärmt.

10% und 30%ige Sucroslösung: 10% bzw. 30% Sucrose wurden in 1x PBS gelöst und bei 4° C gelagert.

TAE-Puffer: Eine Lösung auf 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA wurde als Laufpuffer für die Gelelektrophorese verwendet.

### 3.6 Versuchstiere

Alle Versuche an Tieren erfolgten nach den Richtlinien des Instituts für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie sowie den Regularien der Universität Jena und des Freistaates Thüringen.

Für die Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse des C57BL/6J sowie des NOR Stammes verwendet. Diese wurden in einem klimatisierten Raum gehalten, welcher einen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus aufwies. Um eine exakte Altersbestimmung pränataler Tiere zu gewährleisten wurden die Mäuse von 15.00 Uhr bis 7.00 Uhr des folgenden Tages verpaart, welcher als Embryonaltag E1 geführt wurde. Die darauffolgenden Tage wurden dementsprechend als E2 – E21 bezeichnet. Die Mäuse wurden in regelmäßigen Abständen gewogen, um eine mögliche Schwangerschaft festzustellen. Eine Schwangerschaft lag höchstwahrscheinlich vor, wenn die Tiere z.B. am Embryonaltag E14 eine Gewichtszunahme von ca. 6-10 g zum Embryonaltag E1 aufwiesen. Der Tag der Geburt entsprach dem Postnataltag P0 und alle weiteren Tage P1 – P(n).

Für die Entnahme von Primärgewebe wurde den Mäusen 1 ml Chloralhydrat (10 % Chloralhydrat in PBS) intraperitoneal injiziert und sichergestellt, dass die Maus keinerlei Schmerzreaktion mehr aufwies. Nun wurde der Kopf abgetrennt und das adulte Gehirn herauspräpariert oder – zur Entnahme der Embryonen – der Bauchraum sowie das Peritoneum der Maus geöffnet und die Embryonenkette herauspräpariert. Alle weiteren Schritte zur Präparation embryonalen Gewebes erfolgen unter der Sterilbank in sterilfiltrierten Lösungen und mit keimreduziertem Präparierbesteck.

### 3.7 Molekularbiologische Methoden

Für den Nachweis spezifischer mRNA in Primärgewebe wurde eine cDNA-Synthese mit RNA aus Gewebe des Hippocampus einer adulten Maus sowie der MGE von Mausembryonen des Embryonaltages E14,5 durchgeführt. Anschließend wurde mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung spezifischer Primer ermittelt, ob mRNA des Gens Disrupted-in-Schizophrenia 1 in den Geweben vorlag.

### 3.7.1 Gewebepräparation des adulten Hippocampus und der medialen ganglionischen Eminenz des Embryonaltages E14,5

Zur Gewinnung von cDNA aus Primärgewebe wurden alle Schritte unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde der Arbeitsplatz mit RNase-away gereinigt sowie sterile Pipettenspitzen und Präparierbesteck verwendet. Für die Extraktion von RNA aus Primärgewebe wurde eine schwangere Maus am Embryonaltag E14,5 mittels peritonealer Injektion von 1 ml Chloralhydrat betäubt. Die Embryonenkette sowie der Kopf der Mutter wurden in Petrischalen überführt. Nachdem das Kopffell entfernt wurde, folgte die Präparation des adulten Gehirnes der Muttermaus, indem Gehirn plus Schädeldach mit einer Schere vom *Neurocranium* getrennt wurden und die Jochbeine durchgeschnitten wurden. Nun folgte die Trennung der Schädelknochen vom Gehirn durch Abziehen mittels Pinzetten, sodass das Gehirn frei lag. Ein medial geführter Schnitt mittels Skalpell trennte beide Hemisphären voneinander und es erfolgte die Entfernung des Thalamus aus beiden Hemisphären. Die Hippocampi wurden mit Hilfe einer Präpariernadel und einer Pinzette entnommen und in 500 µl Trizol auf Eis gesammelt.

Die Präparation der MGE von acht Embryonen erfolgte in eisgekühltem PBS wie unter 3.8.1 beschrieben. Diese wurden ebenfalls in 500 µl Trizol gesammelt und für die cDNA-Synthese weiterverwendet.

### 3.7.2 cDNA-Synthese aus primären Gewebeproben

Das in Trizol gesammelte Primärgewebe, wurde zunächst mittels Homogenisator auf Eis homogenisiert und mit Hilfe einer Spritze (Kanüle Ø 0,6 mm) 10 mal resuspendiert um die genomische DNA durch Scherkräfte zu fragmentieren. Nun folgten ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4° C und 12.000 g, die Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß und ein Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 5 min. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform und vorsichtigem Durchmischen für 15 s (nicht gevortext!) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4° C und 12.000 g für 15 min. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und es wurden 500 µl Isopropylalkohol zugegeben. Dies wurde vorsichtig durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4° C und 12.000 g für 10 min, wonach der Überstand verworfen und 1 ml eisgekühlter 70%-iger Alkohol zugegeben wurde. Nach vorsichtigem Durchmischen folgte der letzte Zentrifu-

gationsschritt bei 4° C und 7.500 g für 5 min. Der gesamte Überstand wurde abgenommen, das entstandene Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und bei 55° C im Heizblock in 20 µl DEPEC-Wasser gelöst.

Es folgte ein DNase-Verdau um verbliebene genomische DNA in ihre Nukleotidbestandteile zu zerlegen. Hierfür wurde mindestens 1 µg RNA mit 1 µl 10x DNase I-Puffer sowie 1 µl DNase I gemischt, mit DEPEC-Wasser auf 9 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei 37° C für 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA wurde das Gemisch für 10 min bei 70° C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

Um zu überprüfen, dass keinerlei Verunreinigung durch genomische DNA mehr vorlag wurden 200 – 500 ng RNA auf ein 1%-iges Agarosegel geladen. Hierfür musste die RNA mit 10 µl Formamid bei 99° C für 5 min gekocht werden. Danach wurden 8 µl DEPEC-Wasser sowie 2 µl Ladepuffer zugegeben und die Probe auf das Gel gebracht. Es folgte eine Gelelektrophorese in TAE-Puffer bei 140 V für 30 min. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht und wurde mit einer CCD-Kamera dokumentiert. Auf dem Gel sollten zwei Banden sichtbar sein, die 18S rRNA sowie die 28S rRNA, welche ein Fluoreszenzverhältnis von 1:2 aufweisen sollten. Waren weitere Banden zu erkennen, handelte es sich um DNA-Verunreinigungen und der DNase Verdau musste wiederholt werden.

Zur cDNA-Synthese wurden 10 µg RNA mit 30 pmol Oligo-dT-Primern vermischt, mit DEPEC-Wasser auf 11 µl aufgefüllt, 5 min bei 70° C inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Nun wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer (für reverse Transkription), 2 µl 10 mM dNTPs sowie 3 µl DEPEC-Wasser zugegeben und das Gemisch für 5 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 200 U Reverse Transkriptase zugeführt. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 42° C, eine Deaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 min bei 70° C und das Abkühlen auf Eis. Die Proben wurden bei -20° C gelagert oder direkt für den Nachweis spezifischer mRNA verwendet.

### *3.7.3 Nachweis spezifischer mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Der Nachweis spezifischer mRNA erfolgte durch PCR mit der synthetisierten cDNA und anschließender Gelelektrophorese. Für die PCR wurde 1 µl cDNA mit 16,5 µl A. bidest., 2,5 µl 10x Polymerasepuffer, 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 25 mM dNTPs, 1 µl 25 mM forward Primer (Sequenz: ACCCAGGATAGCCTGCCTGCA), 1 µl 25 mM reverse Primer (Sequenz: ATCAGGTCACAGCCCGGCCA) und 0,3 µl Hot Start Taq Polymerase vermischt.

Die Polymerase wurde durch 15 minütige Inkubation des PCR-Ansatzes bei 95° C aktiviert. Es folgte ein PCR-Programm mit 35 Zyklen a 30 s bei 95° C (Degradation), 30 s bei 57° C („Annealing“) und 1 min bei 72° C (Elongation). Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl Ladepuffer auf ein 1%-iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese (45 min, 140 V in TAE-Puffer) aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Bestrahlung mit Hilfe einer CCD-Kamera.

## 3.8 Primärkultur

### 3.8.1 Herstellung primärer embryonaler Einzelzellen

Die Embryonen wurden aus dem zuvor entnommenen Uterus herauspräpariert und die Köpfe in kalten Krebspuffer (126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> und 11 mM D-Glucose in A. bidest.) überführt. Nach dem Entfernen der Kopf- sowie der Hirnhaut erfolgte die Freilegung des embryonalen Gehirns durch dessen Isolierung von der Schädelbasis. Es folgte die Trennung der beiden Hemisphären vom Neuralrohr und das Entfernen der anterioren sowie der posterioren Strukturen, so dass einzig basales Telencephalon und somatosensorischer Kortex verblieben. Die MGE sowie der somatosensorische Kortex wurden herauspräpariert und in HBSS-Glukose (0,65% Glukose in HBSS) auf Eis gesammelt. Es folgte eine Trypsinreaktion in 0,05% Trypsin in HBSS-Glukose für 17 min bei 37° C, wonach das Gewebe in Einzelzellmedium (10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin 1% L-Glutamin, 0,1% D-Glukose in DMEM mit Natriumpyrovat und Pyridoxin) überführt, mit einer abgerundeten Pasteurpipette resuspendiert und durch ein GazeNetz (Maschenweite: 200 µm<sup>2</sup>) pipettiert wurde um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Thomakammer. Die Neurone der MGE wurden mit einer Dichte von 45.000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf Deckgläschen kultiviert, die zuvor in HNO<sub>3</sub> gereinigt und mit 19,5 µg/ml Laminin und 5 µg/ml poly-L-Lysin in GBSS für 30 min bei 37° C beschichtet wurden. Nach Kultivierung für 2 h im Inkubator (37° C und 5% CO<sub>2</sub>) wurde 1 ml Neurobasalmedium (0,5% D-Glukose, 1% L-Glutamin, 2% B27, 2% Penicillin/Streptomycin in Neurobasalmedium) zugegeben und nach einem Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Fixierung der Neurone erfolgte nach 2 Tagen für 30 min in 4% PFA in PBS. Die Zellen des somatosensorischen Kortex fanden bei der Herstellung des „feeder layer“ (siehe 3.8.5) sowie für immunzytochemische Markierungen Verwendung.

### 3.8.2 Transfektion von embryonalem Primärgewebe mittels *ex utero* Elektroporation

Die Hemisphären eines embryonalen Gehirns (Embryonaltag E14,5) wurden wie unter 3.8.1 beschrieben präpariert und in eiskaltem Krebspuffer gesammelt, ohne den anterioren und posterioren Teil zu entfernen. Nach der Überführung einer Hemisphäre auf eine flache Platinelektrode (angeschlossen an den Pluspol eines BTX ECM 830 Elektroporators) mit PBS wurde mit einer Glaskapillare die Plasmidlösung (1 µg/µl DISC1-/kontroll-miRNA-Konstrukt, 2% fast green, 2% HEPES in PBS oder 2,25 µg/µl humanes-/murines DISC1-Expressionsplasmid mit 0,75 µg/µl DISC1-miRNA-Konstrukten, 2% fast green, 2% HEPES in PBS) in das Gewebe der MGE (oder für die Validierung des Lhx6-IRES-GFP Vektors zusätzlich 0,5 µg/µl Lhx6-IHRES-GFP, 2% fast green, 2% HEPES in PBS in den Kortex) injiziert. Nun folgte das Applizieren zweier elektrischer Pulse (100 V, 100 ms Dauer) über eine Platinelektrode, die über dem zu transfizierenden Gewebe platziert und mit dem Minuspol des Elektroporators verbunden war. Die Hemisphäre wurde sofort wieder in eiskaltem Krebspuffer überführt. Diese Methode wurde in Anlehnung an die Arbeit von (Yozu et al., 2005) übernommen und angepasst.

### 3.8.3 Plasmacot mit transfiziertem Primärgewebe

Nach einer *ex utero* Elektroporation wurden die MGE aus den Hemisphären präpariert, in MZ-Medium (0,4 g Methylzellulose, 5 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 1% D-Glukose) überführt und mittels eines McIlwain Tissue Choppers in 200 x 200 µm große Explantate geschnitten. Nach einer Inkubation bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> für 1 h wurden ca. 20 Explantate in 20 µl Huhnplasma, welches auf ein rundes Deckglas aufgebracht war, überführt. Es folgte die Vernetzung des Huhnplasmas durch das Aufbringen von 10 µl Thrombin und die Kultivierung der Plasmacots für zwei Tage in MZ-Medium bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach der Fixierung in 4% PFA in PBS wurden die Plasmacots in Mowiol eingedeckelt.

#### **Auswertung der Plasmacots**

Mit Hilfe eines Axiovert-S100 (Plan Neofluar x20 Objektiv NA: 0,5; ZEISS) wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die aus den Explantaten ausmigriert waren und der Mittelwert der ausmigrierten Zellen pro Explantat errechnet. Dabei wurde sichergestellt, dass

Zellen im Explantat transfiziert waren und nichttransfizierte Zellen aus dem Explantat ausgewandert waren.

### 3.8.4 Schnittkultur aus transfizierten embryonalen Gehirnen

Nach einer *ex utero* Elektroporation wurden die in Krebspuffer überführten Hemisphären in 37° C warme „low melt“ Agarose eingebettet (4% „low melt“ Agarose in PBS bei 65° C gelöst und mindestens 15 min bei 37° C abgekühlt) und weitere 15 min bei 4° C gelagert, bis die Agarose ausgehärtet war. Anschließend erfolgte die Herstellung 250 µm dicker Vibratomschnitte, welche in „post holding“ Puffer gesammelt (10 mM HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1% Geneticin in Krebspuffer) und auf Whatman-Membranen aufgebracht wurden, die auf Neurobasalmedium (0,5% D-Glukose, 1% L-Glutamin, 2% B27, 2% Penicillin/Streptomycin in Neurobasalmedium) in einer Petrischale schwammen. Die Schnittkulturen wurden drei Tage bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, danach in 4% PFA in PBS fixiert und in Mowiol eingedeckelt.

#### **Auswertung der Schnittkulturen**

An einem Axiovert-S100 (Plan Neofluar x20 Objektiv NA: 0,5; ZEISS) wurden die transfizierten Zellen in der LGE sowie im Kortex der Schnitte gezählt. Die Gesamtzahl der transfizierten Zellen in Kortex und LGE entsprach 100% und der jeweilige Anteil der Neuronen in der LGE oder im Kortex wurden als Prozentsatz berechnet.

### 3.8.5 Herstellung eines „feeder layers“ zur Visualisierung der Dynamik embryonaler transfizierter Interneurone aus der MGE

Die Hemisphären von E14,5 Embryos wurden wie unter 3.8.1 beschrieben präpariert und der somatosensorische Kortex in HBSS-Glukose gesammelt. Das basale Telencephalon wurde in kalten Krebspuffer überführt und zur *ex utero* Elektroporation herangezogen, die wie unter 3.8.2 beschrieben durchgeführt wurde. Es folgte die Präparation der transfizierten MGE, die ebenfalls in HBSS-Glukose gesammelt wurden. Aus den präparierten Geweben wurden – wie unter 3.8.1 beschrieben – Einzelzellen hergestellt. Die kortikalen Neurone dienten als „feeder layer“ für die Neurone der MGE und wurden mit einer Dichte von 195.000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf salpetersäuregereinigte Deckgläschen aufgebracht, die mit 19,5 µg/ml Laminin und 5 µg/ml poly-L-Lysin in GBSS präinkubiert waren. 15 min später wurden die transfizierten Zellen der MGE in einer Dichte von 50.000

Zellen/cm<sup>2</sup> ebenfalls auf die Deckgläschen pipettiert. Nach Beendigung des Adhäsionsprozesses sowie nach 24 h im Inkubator bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte ein Mediumwechsel zu farblosem Neurobasalmedium (0,5% D-Glukose, 1% L-Glutamin, 2% B27, 2% Penicillin/Streptomycin in Neurobasalmedium).

### **„Time lapse“ Videomikroskopie**

Nach 36 h Inkubation der „feeder layer“ Kultur wurden die Deckgläschen auf eine Petripermembran überführt und mit einem LSM510 (Axiovert-S200, Plan Apochromat x20 Objektiv NA: 0,75) in Kombination mit einer Inkubationskammer (37° C und 5% CO<sub>2</sub>) 40 minütige Zeitrafferfilme der transfizierten Zellen aufgenommen. Hierzu fanden ein Argon Laser (Anregung 488 nm, Emission: Bandpass 500 - 550 nm + Durchlicht) sowie ein HeNe Laser (Anregung 543 nm, Emission: Langpass 560 nm) Verwendung. Es wurden transfizierte Interneurone auf dem Deckglas gesucht und die Position gespeichert, sodass die Aufnahme mehrerer Zellen gleichzeitig möglich war.

### **Auswertung der Zeitrafferfilme**

Die Filme der einzelnen Zellen wurden mit Hilfe des Programms ZEN2011-LE (ZEISS) ausgewertet. Hierzu wurde die zurückgelegte Strecke jeder Zelle pro Zeiteinheit ermittelt, in Microsoft Excel® übertragen und die Gesamtstrecke sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit jedes Interneurons ermittelt. Des Weiteren wurde für jede Zelle die Anzahl der somalen Translokationen (schnelle, sprunghafte Bewegungen des Zellsomas inklusive Zellkern) innerhalb von 40 min bestimmt.

## **3.9 Immunhisto- und Immunzytochemische Methoden**

### **3.9.1 Perfusion adulter Mäuse**

Eine adulte Maus wurde mittels intraperitonealer Injektion mit 1 ml 10% Chloralhydrat in PBS betäubt. Nachdem sichergestellt war, dass bei der Maus keinerlei Schmerzreaktion mehr zu beobachten waren wurde eine *transcardiale* Perfusion durchgeführt, wobei der Brustraum eröffnet und eine Kanüle in die linke Herzkammer geführt wurde, durch die ca. 2 min PBS und danach 4% PFA in PBS bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5-8 ml/min 20 min lang geleitet wurde. Es erfolgte die Trennung des *Sinus venosus* von der rechten Herzkammer um den Abfluss des PBS sowie des Fixativs zu gewährleisten.



ten. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und in 4% PFA in PBS 12 h bei 4° C nachfixiert. Es folgte eine Inkubation in 10% und 30% Sucrose in PBS jeweils für ca. 24 h bei 4° C.

### *3.9.2 Fixieren, Einfrieren und Herstellen von Kryostatschnitten aus Hirn gewebe*

Embryonale Gehirne wurden wie unter 3.6 und 3.8.1 beschrieben präpariert und in 4% PFA in PBS bei 4° C für 5 h fixiert. Es folgte eine Inkubation in 10% und 30% Sucrose in PBS jeweils für ca. 24 h bei 4° C. Das Einfrieren embryonaler sowie adulter Gehirne erfolgte in -45° C kaltem Isopentan (Becherglas mit Isopentan auf Trockeneis) für 1 min. Die Gehirne wurden bei -80° C bis zum Anfertigen von Kryostatschnitten gelagert. Der Kryostat wurde auf -22° C heruntergekühlt und die Gehirne mit Tissue Taq aufgeblickt um 18 µm dicke Kryostatschnitte anzufertigen, die auf „Super frost“ Objektträger aufgebracht wurden. Nachdem die Schnitte 30 min getrocknet waren wurden diese bei -20° C gelagert oder es schloss sich direkt eine immunhistochemische Markierung an.

### *3.9.3 Immunhistochemie an Kryostatschnitten*

Die bei -20° C gelagerten Kryostatschnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut oder direkt nach Beendigung des Schneidens sowie des Trocknens 3x 15 min in 0,2% TritonX-100 in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Blockierung in 0,5% BSA, 10% Esel- bzw. Ziegen serum, 0,2% TritonX-100 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur in einer „feuchten Kammer“, woran sich die Primärantikörper-Reaktion bei 4° C über Nacht anschloss. Hierfür wurden die Primärantikörper in Blockierlösung verdünnt (Ziege anti DISC1 1:50; Hase anti Calbindin 1:1000; Hase anti Lhx6 1:100) und in ein Volumen von 200 µl auf jeden Objektträger pipettiert. Am nächsten Tag erfolgten weitere 3 Waschschr itte a 15 min in 0,2% TritonX-100 in PBS, woran sich die Sekundärantikörper-Reaktion für 1,5 h bei Raumtemperatur anschloss. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in Blockierlösung verdünnt (Cy3 Esel anti Ziege 1:2.000; Ziege anti Hase Alexa<sup>488</sup> 1:1000; Ziege anti Hase Cy3 1:2000) und in einer „feuchten Kammer“ mit einem Volumen von 200 µl pro Objektträger aufgebracht. Es erfolgten weitere 3 Waschschr itte a 15 min in 0,2% TritonX-100 in PBS, die Färbung der Zellkerne mit 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:1.000 in PBS, ein kurzes Spülen in A. dest. und das Eindeckeln in Mowiol.

### 3.9.4 Immunzytochemie an embryonalen Einzelzellen

DISC1-miRNA oder Kontroll-Konstrukten transfizierte Einzelzellen aus der MGE wurden nach zwei Tagen in Kultur mit 4% PFA in PBS fixiert, 3 x 5 min in 0,2% TritonX-100 in PBS auf einem Schüttler bei RT gewaschen und mit Blockierlösung (10% Ziegen-/Eselserum, 5% BSA und 0,2% TritonX-100 in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte die Primärantikörperreaktion in Blockierlösung (Maus anti Aktin 1:50; Hase anti pGirdin 1:50; Hase anti pAkt 1:500; Ziege anti DISC1 1:50; Ziege anti GFP 1:400; Hase anti GFP) für 12 h bei 4°. Nun folgten 4 Waschschrte in 0,2% TritonX-100 in PBS a 10 min bei RT auf einem Schüttler und die Sekundärantikörperreaktion mit Esel anti Ziege Cy3 1:1000, Esel anti Hase Cy3 1:2000; Esel anti Ziege DyLight<sup>488</sup> 1:500; Ziege anti Maus Texas Red 1:100 und Ziege anti Hase Cy2 1:200 in Blockierlösung für 2 h bei RT. Zusätzlich wurde an diesem Punkt eine Phalloidininfärbung 1:200 in der jeweiligen Blockierlösung durchgeführt. Hier schlossen sich weitere 5 Waschschrte in 0,2% TritonX-100 in PBS a 10 min bei RT auf einem Schüttler, ein Waschschrte a 10 min in PBS, ein kurzes Eintauchen in A.dest. und das Eindeckeln in Mowiol an.

#### Auswertung der Fluoreszenzintensitäten

Transfizierte Zellen, welche mit pGirdin, DISC1 oder pAkt-Antikörpern gefärbt waren wurden mit einem mit einem LSM510 (Axiovert-S200, Plan Apochromat x60 Objektiv NA: 1,4) gescannt. Hierzu fanden ein Argon Laser (Anregung 488 nm, Emission: Bandpass 500 – 550 nm + Durchlicht) sowie ein HeNe Laser (Anregung 543 nm, Emission: Langpass 560 nm) Verwendung. Für die Aufnahmen der phalloidinmarkierten Zellen und der mit Aktin-Antikörpern markierten Zellen wurde ein Axiovert-S100, Plan Neofluar x40 Objektiv NA: 0,45 in Kombination mit einer Spot Kamera verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten im roten Emissionsbereich der transfizierten Zellen bzw. Zellteilen wurde mit dem Programm ImageJ ermittelt, indem der mittlere Grauwert der transfizierten Zellen eines Bildes und als Referenz die der nicht-transfizierten Zellen gemessen und in Relation gesetzt wurde. Nun wurden die relativen Grauwerte von kontroll- und DISC1-miRNA-transfizierten Zellen mit Hilfe eines t-Tests verglichen

### 3.10 *In utero* Elektroporation

Einer schwangeren Maus wurde am Embryonaltag E13,5 eine subcutane Injektion 4% Rimadyl in Salinelösung (0,9% NaCl in A. bidest.) als Schmerzmittel verabreicht. Nach 30 min wurde ein Anästhetikum (0,05 mg/kg Fentanyl; 5 mg/kg Midazolam; 0,5 mg/kg Medetomidin [aus Tierklinik Jena bezogen]) intraperitoneal injiziert. Es folgte Rasur und Desinfektion der Bauchdecke sowie die Überprüfung der Schmerzunempfindlichkeit. Die Augen der Maus wurden mit Salinelösung beträufelt um das Austrocknen der *Cornea* zu verhindern. Es folgte die Eröffnung der Bauchdecke sowie des Peritoneums mittels Skalpell und die Freilegung eines Uterushorns. Mit einer Glaskapillare wurde ca. 1 µl Plasmidlösung (1,5 µg/µl DISC1 miRNA + 0,5 µg/µl Lhx6-IRES-GFP oder Kontroll-miRNA + 0,5 µg/µl Lhx6-IRES-GFP in PBS + 20% fast green) in die Ventrikel eines Embryogehirns injiziert, dessen Lage mit Hilfe einer Kaltlichtquelle bestimmt wurde. Um die Zellen der MGE mit den DNA-Konstrukten zu transfizieren erfolgte eine Elektroporation (5 Pulse; 40 V; 100 ms Dauer; BTX ECM 830 HARVARD APPARATUS) mit einer Pinzettenelektrode, die mit dem Pluspol in Richtung MGE wies. Nach Beendigung der Injektion sowie der Elektroporation beider Uterushörner erfolgte die Rückführung der Uterushörner in das Peritoneum und die Befüllung des Peritoneums mit Saline. Das Peritoneum sowie die Bauchhaut wurden mittels Nähfaden (Vicryl) verschlossen und die Maus durch Injektion des Antidots (1,2mg/kg Naloxon; 2,5mg/kg Atipamezol; 0,5mg/kg Flumazenil) aus der Narkose erweckt. Die Entnahme der Embryonen erfolgte nach drei Tagen *in utero* durch eine intraperitoneale Injektion von 1 ml 10% Chloralhydrat in PBS und der Präparation der Embryonen wie unter 3.6 beschrieben. Die Embryonenköpfe wurden für 5 h in 4% PFA in PBS fixiert. Nach der Präparation der Gehirne erfolgte die Einbettung in 4% „low melt“ Agarose in PBS und das Herstellen 100 µm dicker Vibratomschnitte, die in PBS gesammelt wurden. Um das GFP-Signal sichtbar zu machen erfolgte eine Immunhistochemische Markierung des GFP Proteins. Hierfür wurden die Schnitte 3 x 10 min in 0,2% TritonX-100 in PBS gewaschen, mit Blockierlösung (10% Eselserum, 5% BSA und 0,2% TritonX-100 in PBS) für 1 h blockiert und mit Hase anti GFP (1:1.000 in Blockierlösung) über Nacht bei 4° C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Detektion des Primärantikörpers mit Esel anti Hase Cy3 (1:2.000 in Blockierlösung) für 2 h, nachdem die Schnitte 4 x 10 min in 0,2% TritonX-100 in PBS gewaschen wurden. Die Detektion des GFP wurde mit weiteren 4 Waschschritten in 0,2% Tri-

tonX-100 in PBS, der Färbung der Zellkerne mittels DAPI in PBS für 30 min und dem Eindeckeln der Schnitte in Mowiol beendet.

### **Auswertung der *in utero* Elektroporation**

Mit einem Axiovert-S100 (Plan Neofluar x20 Objektiv NA: 0,5; ZEISS) erfolgte die Auswertung der Schnitte. Die Aufnahme eines typischen Beispiels erfolgte mit einem Zeiss LSM510 (C-Apochromat x10 Wasserimmersionsobjektiv NA: 0,45; HeNe laser 543 nm Absorptionswellenlänge und Langpassfilter 560 nm). Zur Auswertung der Migration von Zellen aus der MGE in den elektroporierten Schnitten wurde die Anzahl der transfizierten Zellen in der LGE und im Kortex ermittelt. Die Gesamtzahl der transfizierten Zellen in Kortex und LGE entsprach 100% und der jeweilige Anteil der Neuronen in der LGE oder im Kortex wurden als Prozentsatz berechnet.

## 4 Ergebnisse

„Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1) ist ein Risikogen für Schizophrenie und andere mentale Erkrankungen, wie bipolare Störungen, Depression und Angststörungen. Es wurde bereits gezeigt, dass DISC1 bei verschiedenen Entwicklungsprozessen des Gehirns eine entscheidende Rolle spielt. (Narayan et al., 2013) Dazu zählen die Proliferation und radiale Migration von Projektionsneuronen des Kortex sowie die Positionierung und das Auswachsen von Neuriten hippocampaler Nervenzellen. Liegt DISC1 als mutierte Form vor oder ist die Expression dieses Gens verändert, verlaufen diese Entwicklungsprozesse fehlerhaft und es können als Folge dessen Verhaltensauffälligkeiten sowohl bei Schizophreniepatienten als auch im Tierversuch beobachtet werden (Mao et al., 2009; Brandon and Sawa, 2011). Man unterscheidet Positivsymptome, wie Hyperaktivität oder Halluzinationen sowie Negativsymptome, zu denen Apathie, soziale Zurückgezogenheit oder Defizite bei Lern- und Gedächtnisprozessen gehören. Für das Verständnis dieser Krankheiten und zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze ist es von entscheidender Bedeutung die Funktionen dieses Gens während der Entwicklung des Gehirns zu verstehen. (Kamiya et al., 2005; Brandon et al., 2009; Young-Pearse et al., 2010; Kandel, 2012; Lehmann et al., 2012)

Es wurde ebenfalls beschrieben, dass Patienten mit Schizophrenie Defizite in der Anzahl oder der Komposition GABAerge Interneurone in der Hirnrinde aufweisen (Benes and Berretta, 2001; Lewis et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass DISC1 während der Entwicklung in GABAergen Interneuronen exprimiert und für die korrekte Migration dieser Nervenzellen von ihrem Entstehungsort – den ganglionischen Eminenzen – zum Kortex notwendig ist. Außerdem wird eine neue Funktion von DISC1 während der Entstehung des Gehirns der Maus beschrieben und ein Erklärungsansatz für eine verringerte Anzahl GABAerger Zellen in Schizophreniepatienten hervorgebracht.

### 4.1 DISC1 ist während der Entwicklung des Gehirns der Maus in Interneuronen der MGE exprimiert

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass das Gen „Disrupted-in-Schizophrenia-1“ während der Entwicklung des Gehirns in proliferierenden Zellen des Kortex sowie im

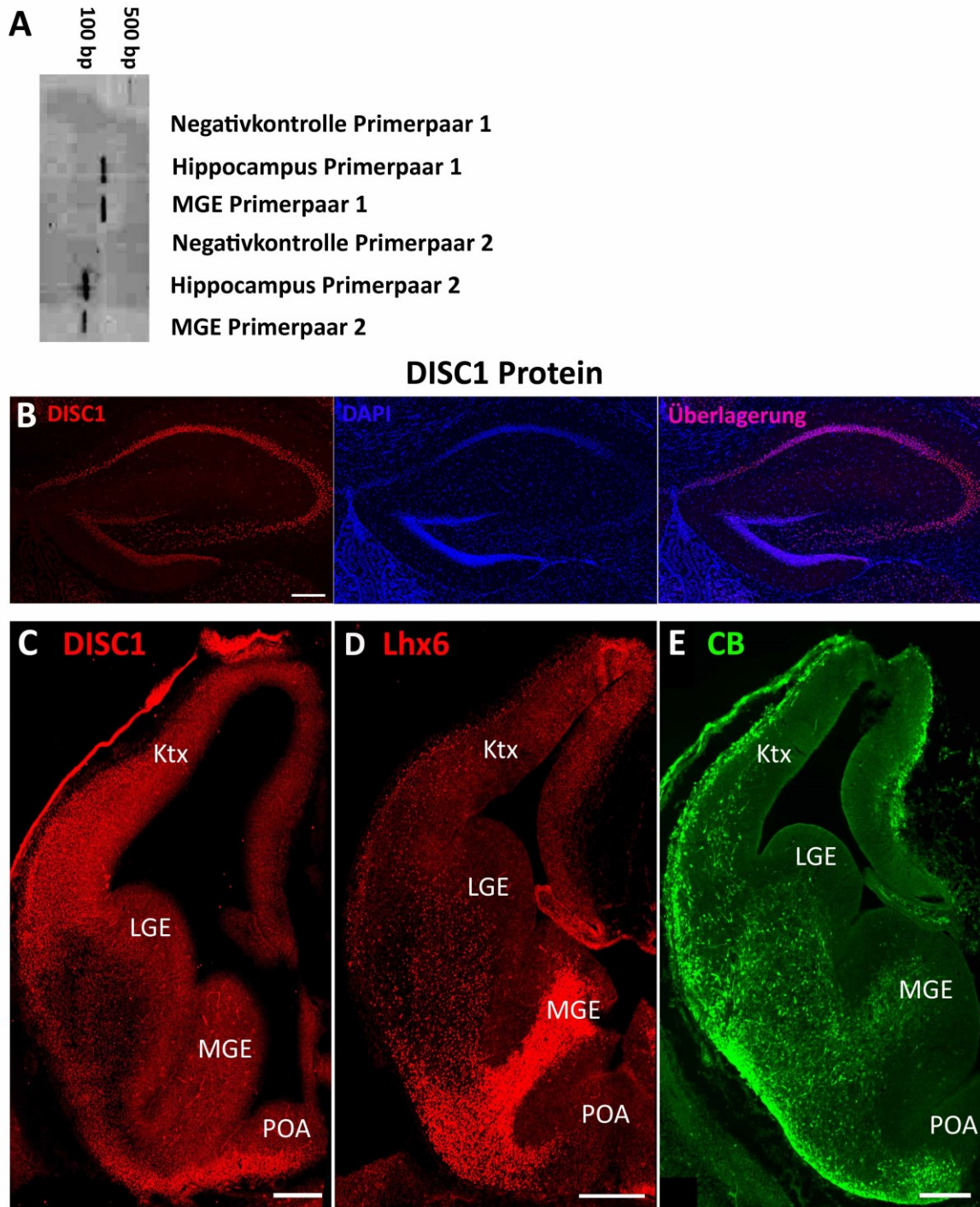
adulten Hippocampus exprimiert ist (Enomoto et al., 2009; Mao et al., 2009). In diesen Studien erfolgte allerdings kein Expressionsnachweis des Gens in der MGE, wo am Embryonaltag E14,5 der Maus die meisten parvalbuminergen und somatostatinergen Interneurone geboren werden (Wonders and Anderson, 2006). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob DISC1 am Embryonaltag E14,5 in der MGE exprimiert wird.

#### 4.1.1 *DISC1 wird am Embryonaltag E14,5 in der MGE transkribiert*

Zum Nachweis von DISC1-mRNA wurden zunächst die MGEs von Embryonen am Embryonaltag E14,5 präpariert und daraus die RNA isoliert. Da im adulten Hippocampus der Maus bereits eine Expression von DISC1 nachgewiesen wurde, diente der Hippocampus des Muttertieres als Positivkontrolle bei diesem Versuch (Enomoto et al., 2009). Er wurde ebenfalls herauspräpariert und die darin enthaltene RNA isoliert. Es folgte eine DNase Reaktion, um sicherzustellen, dass die RNA beider Hirnregionen keine Verunreinigung mit genomischer DNA enthält. Nun erfolgte die Synthese der cDNA, die als Matrize für die anschließende PCR mit zwei spezifischen Primerpaaren für das DISC1-Gen diente. Mit beiden Primerpaaren konnten cDNA-Fragmente definierter Länge (Primerpaar 1: 145 bp; Primerpaar 2: 99 bp) sowohl aus dem Hippocampus als auch der MGE amplifiziert werden. Die Negativkontrolle wies keinerlei Banden auf. Somit enthält die MGE am Embryonaltag E14,5 DISC1 mRNA, was bedeutet, dass das DISC1-Gen transkribiert wird (Abb. 6A).

#### 4.1.2 *DISC1 ist auf Proteinebene in der MGE am Embryonaltag E14,5 exprimiert*

Um zu untersuchen, ob die vorhandene mRNA am Embryonaltag E14,5 in der MGE translatiert wird, wurden an Kryostatschnitten Immunreaktionen durchgeführt. Da im adulten Hippocampus bereits eine Expression von DISC1 beschrieben wurde, dienten Kryostatschnitte dieser Region dazu die Spezifität des Antikörpers gegen den N-terminalen Teil des DISC1-Proteins nachzuweisen. In Abb. 6B ist ein zelluläres DISC1-Signal in den *Cornu ammoni* (CA) 1-3 sowie in der Hilusregion des Hippocampus zu erkennen. Dadurch war anzunehmen, dass der Antikörper spezifisch das DISC1-Protein bindet, und es erfolgten Immunreaktionen an coronalen Kryostatschnitten embryonaler Gehirne (E14,5). Wie in Abb. 6C dargestellt ist DISC1 am Embryonaltag E14,5 in der Ventrikularzone (VZ) und der Subventrikularzone (SVZ) des Kortex stark exprimiert.



**Abb. 6: DISC1 ist während der Gehirnentwicklung im Entstehungsort GABAerger Interneurone exprimiert**

**(A)**, Gelbild nach PCR mit spezifischen DISC1-Primerpaaren (1 und 2) und elektrophoretischer Auftrennung zeigt, dass sowohl in Primärgewebe des adulten Hippocampus sowie der embryonalen MGE DISC1-mRNA nachzuweisen ist. **(B)**, Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen DISC1 an Kryostatschnitten einer adulten Maus zeigt eine zelluläre Färbung der Cornu ammoni 1-3 sowie der Hilusregion. **(C)**, DISC1 Immunhistochemie an embryonalen Hirnschnitten (E14,5) verdeutlicht, dass DISC1 sowohl in Zellen des Kortex als auch im Entstehungsort und auf dem Migrationsweg kortikaler Interneurone im basalen Telencephalon exprimiert ist. **(D, E)**, Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Lhx6 und CB legen eine überlagerte Expression der interneuronspezifischen Gene und DISC1 nahe. Skalenbalken: 200 µm. Ktx: Kortex, LGE: laterale ganglionische Eminenz, MGE: mediale ganglionische Eminenz, POA: präoptisches Areal.

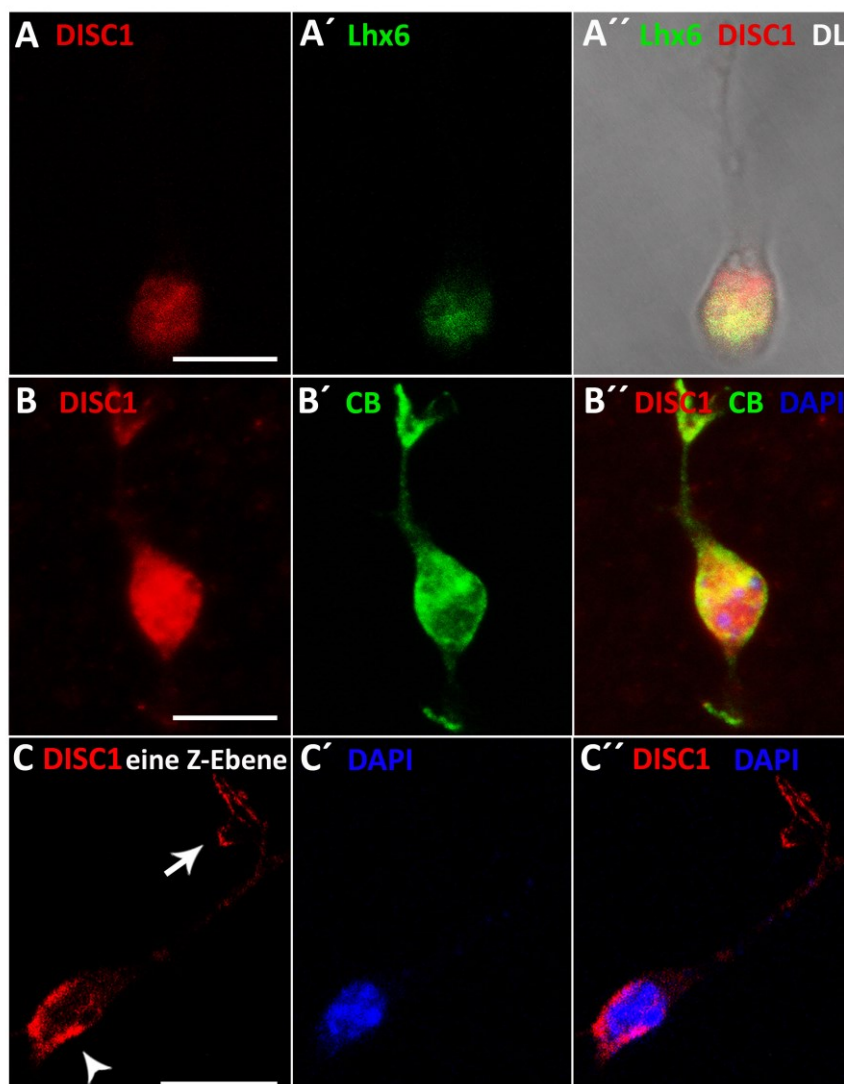


Im basalen Telencephalon konnte mit Hilfe der Immunreaktion ebenfalls ein DISC1-Signal in der VZ sowie der SVZ der LGE als auch der MGE und des präoptischen Areals (POA) – einer weiteren Quelle kortikaler Interneurone – nachgewiesen werden.

Es erfolgten weitere Immunreaktionen mit Antikörpern gegen das Protein Limhomeobox-gene 6 (Lhx6) – einem Transkriptionsfaktor für kortikale Interneurone aus der MGE – und Calbindin (CB) – einem weiteren interneuronenspezifischen Protein (Anderson et al., 1997). In Abb. 6D und E sind zelluläre Signale von Lhx6 und CB in der SVZ der MGE und der LGE des basalen Telencephalons zu erkennen. Diese deuten darauf hin, dass DISC1 überlappend mit molekularen Markern für kortikale Interneurone während der Entwicklung des Gehirns – speziell während der Migration kortikaler Interneurone – exprimiert ist (vgl. Abb. 6C).

#### 4.1.3 DISC1 ist in kortikalen Interneuronen der MGE exprimiert und weist eine inhomogene subzelluläre Verteilung auf

Im Folgenden wurde untersucht, ob DISC1 auf zellulärer Ebene in kortikalen Interneu-



**Abb. 7: DISC1 ist in kortikalen Interneuronen am Embryonaltag E14,5 exprimiert und zeigt eine inhomogene subzelluläre Verteilung**

(A, B), Mikroskopische Aufnahmen dissoziierter Zellen aus der MGE (E14,5), welche mit Antikörpern gegen DISC1 und Lhx6 (A) oder CB (B) zweifach immunzytochemisch markiert wurden. Die Zellen exprimieren interneuronenspezifische molekulare Marker und DISC1. (C), Fluoreszenzaufnahme einer einzelnen optischen Ebene von einer immunzytochemisch markierten Zelle aus der MGE. Es ist zu erkennen, dass DISC1 ungleichmäßig in der Zelle vorliegt. Die Markierung zeigt ein starkes Signal in den äußersten Spitzen des Fortsatzes (Pfeil) sowie als Korb ähnliche Struktur hinter dem Zellkern (Pfeilspitze). Skalenbalken: 10 µm. DL: Durchlicht



ronen der embryonalen MGE exprimiert ist. Hierfür wurden dissoziierte Einzelzellen aus den MGEs von Mausembryonen (E14,5) kultiviert, an denen eine zweifache Immunreaktion mit Antikörpern gegen DISC1 sowie interneuronenspezifische molekulare Marker durchgeführt wurde. Wie in Abb. 7A und B dargestellt gibt es Zellen aus der embryonalen MGE, die sowohl ein DISC1-Signal aufweisen als auch Lhx6 bzw. CB positiv sind.

Mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops wurde ein sehr dünner Schnitt durch eine mit DISC1-Antikörpern immunzytochemisch markierte Zelle aufgenommen, was Rückschlüsse über die subzelluläre Verteilung des DISC1-Proteins in der Zelle zuließ. In Abb. 7C ist zu erkennen, dass DISC1 nicht homogen in den Einzelzellen vorliegt. Es kommt zu einer Akkumulation des Proteins in den äußersten Spitzen des Fortsatzes (Abb. 7C Pfeil) und hinter dem Zellkern (Abb. 7C Pfeilspitze).

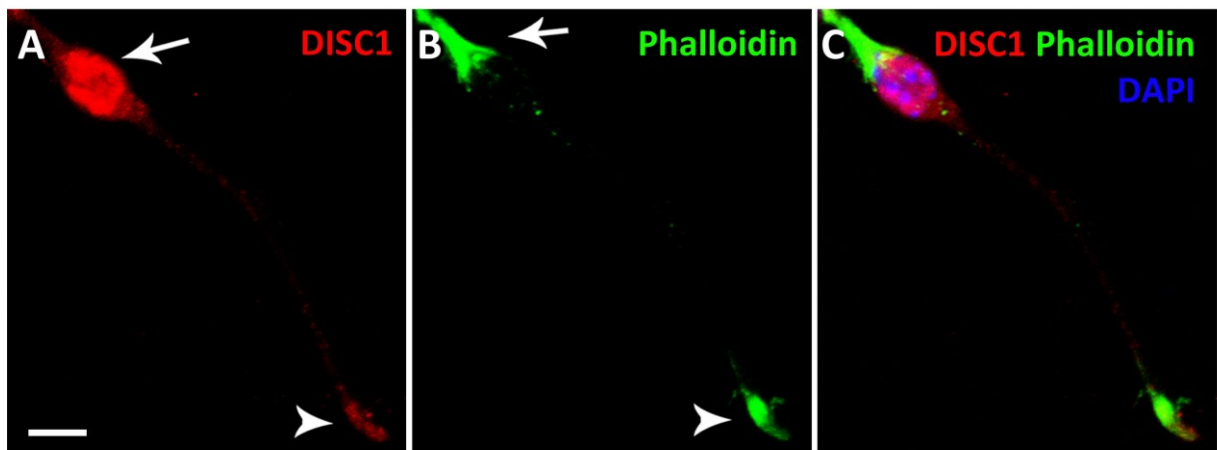
DISC1 ist schalenförmig hinter dem Kern exprimiert, was eine Assoziation mit Aktin-Myosin-Komponenten nahelegt. Diese gewährleisten die saltatorische Bewegung des Kerns nach vorn, indem von ihnen eine Druckkraft ausgeübt wird (Schaar and McConnell, 2005; Martini and Valdeolmillos, 2010). Auch die Expression in den äußersten Filopodien des Fortsatzes suggeriert eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett, welches entscheidend an der Migration kortikaler Interneurone beteiligt ist (He et al., 2010).

## **4.2 DISC1 ist notwendig für die korrekte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts**

Im Folgenden soll geklärt werden, inwiefern DISC1 mit dem Aktin-Zytoskelett kolokalisiert in den Interneuronen vorliegt und ob dieses durch DISC1 beeinflusst wird. Das Aktin-Zytoskelett ist entscheidend an der Migration kortikaler Interneurone beteiligt. Sowohl Aktin-Myosin-Kontraktionen hinter dem Zellkern als auch eine exakte Aktin-Reorganisation in den äußersten Filopodien der Fortsätze sind notwendig für die korrekte Migration von Neuronen (Bellion et al., 2005; He et al., 2010). Somit könnte eine Beeinflussung der Aktin-Expression oder -Reorganisation durch DISC1 Rückschlüsse auf mögliche migratorische Defizite der Interneurone zulassen.

#### 4.2.1 *DISC1 ist in Bereichen dynamischer Fluktuation des Aktin-Zytoskeletts in migrierenden Interneuronen exprimiert*

Da dissoziierte Interneurone auf zwei-dimensionalem Substrat kaum migrieren, die Verteilung von DISC1 aber in migrierenden Interneuronen untersucht werden sollte, kam bei diesem Versuch der Plasmaclot zum Einsatz. Dabei können Interneurone beobachtet werden, die gerichtet aus dem Zellverband auswandern (Wichterle et al., 1999; Steinecke, 2013). Eine genaue Beschreibung des Experiments erfolgt unter 4.3.2. Die Zellen im Plasmaclot wurden einer Färbung mit Phalloidin – einer Substanz, die in das filamentöse Aktin-Zytoskelett (fAktin) integriert – und einer immunzytochemischen Färbung mit Antikörpern gegen DISC1 unterzogen. In Abb. 8A, B und C (Pfeilspitzen) ist dargestellt, dass DISC1 mit dem Phalloidinsignal in den Spitzen des Fortsatzes kolokalisiert vorliegt. Weiterhin ist eine Phalloidinmarkierung hinter dem Zellkern zu erkennen, die teilweise mit dem DISC1-Signal überlappt (Abb. 8A, B Pfeile). Damit ist gezeigt, dass es in migrierenden Interneuronen aus der MGE zu einer Überlagerung von DISC1 mit fAktin kommt, was auf eine Funktion von DISC1 auf die Expression oder die Reorganisation von Aktin hindeutet.



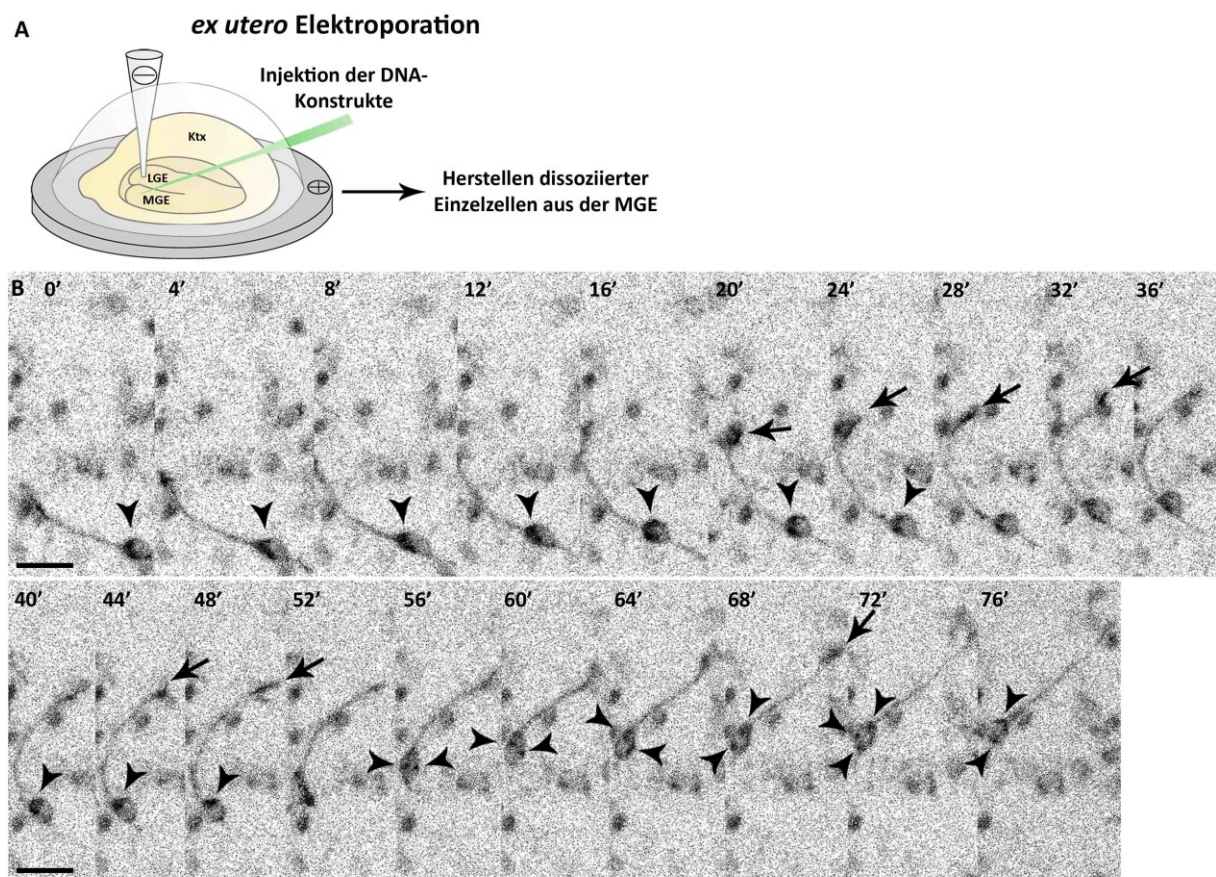
**Abb. 8: DISC1 ist mit filamentösem Aktin in kortikalen Interneurone koexprimiert**

(A, B, C), Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Zelle im Plasmaclot, die mit Phalloidin (B) gefärbt und mit DISC1-Antikörpern (A) immunzytochemisch markiert wurde. Die Pfeilspitzen deuten auf überlagerte Signale in der Spitze des Fortsatzes und die Pfeile auf die somale Expression von fAktin und DISC1 hin. (C), Überlagerung der Aufnahmen aus (A) und (B) plus DAPI-Markierung des Zellkerns. Skalenbalken: 5 µm

Da immunzytochemische Methoden nur einen Zeitpunkt abbilden, das Zytoskelett aber stetigen Veränderungen unterliegt, sollte auch die dynamische Reorganisation von Aktin in Interneuronen während der Migration untersucht werden. Hierfür wurden Interneurone aus der MGE des Embryonaltages E14,5 auf einem kortikalen „feeder layer“ aus

dissoziierten kortikalen Zellen derselben Embryonen kultiviert. Wie in Abb. 9A schematisch dargestellt, wurden die Zellen aus der MGE mit einem DNA-Konstrukt transfiziert, was es erlaubt Aktinkondensationen in den transfizierten Zellen zu beobachten. Das DNA-Konstrukt pAktin-RFP-C1 kodiert Aktinmonomere, die an ein rot-fluoreszierendes Protein (RFP) gekoppelt sind. Für die Transfektion der Zellen aus der MGE wurde eine *ex utero* Elektroporation durchgeführt. Hierfür wurden die Hemisphären der embryonalen Gehirne präpariert und in Krebspuffer auf eine Platinelektrode (Pluspol) überführt. Es erfolgte die Druckinjektion der DNA-Lösung durch eine Glaskapillare in das Gewebe der MGE und die Elektroporation über eine zweite Platinelektrode über der Hemisphäre (Minuspol). Anschließend wurden die Zellen der MGE dissoziiert und auf das zuvor hergestellte „feeder layer“ aufgebracht. Nach 36 h wurden die transfizierten Zellen mit Hilfe eines Lasermikroskops in Kombination mit einer Brutkammer beobachtet.

In Abb. 9B ist eine Zeitreihe eines typischen Interneurons gezeigt, das mit pAktin-RFP-C1 transfiziert wurde. Die Zelle wurde mit einem Intervall von 4 min über einen Zeit-



**Abb. 9: In migrierenden Interneuronen kommt es zu dynamischen Aktin-Kondensationen**

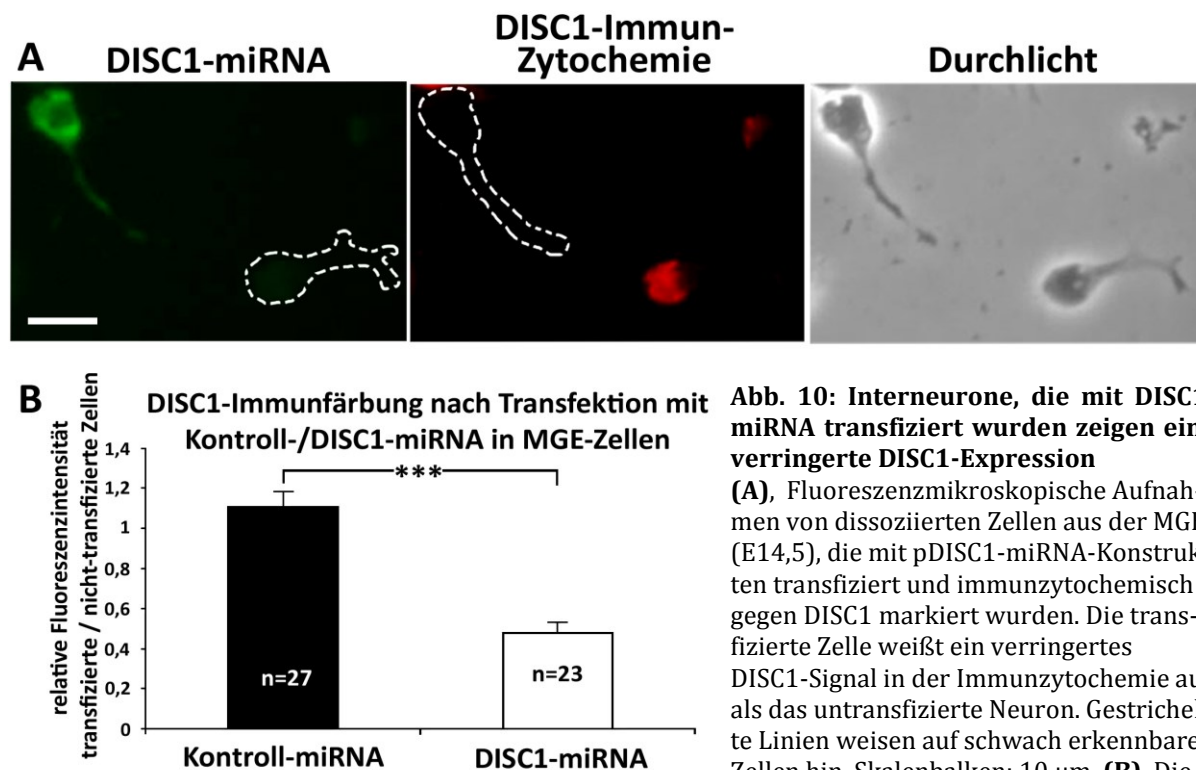
**(A)**, Schematische Darstellung der *ex utero* Elektroporation. **(B)**, Zeitreihe invertierter fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen einer mit pAktin-RFP-C1 transfizierten Zelle über 76 min. Es sind Aktinakkumulationen in Bereichen des Zellsoma (Pfeilspitzen) und in den äußersten Enden des Fortsatzes (Pfeile) zu erkennen. Skalenbalken: 20  $\mu$ m.

raum von 76 min gescannt. Da es sich um invertierte Fluoreszenzaufnahmen handelt, entspricht „schwarz“ dem Aktin-RFP-Signal, weshalb ein sehr dunkler Bereich als Aktin-Akkumulation gedeutet werden kann. Es ist zu erkennen, dass die Zelle zwei saltatorische Bewegungen vollführt, bei denen sich sprunghafte Translokationen des Zellsoma mit Ruhephasen abwechseln. Vor und während der ersten Translokation ist eine starke Akkumulation des Aktin-RFP im Initialsegment des Fortsatzes zu erkennen (Abb. 9B Bilder 0' - 36' Pfeilspitzen). Des Weiteren erscheint eine Aktin-RFP-Kondensation in Filopodien des Fortsatzes während der ersten Translokation sowie zu Beginn und am Ende der zweiten Translokation (Abb. 9B Bilder 20' - 36', 44' - 48' und 68' Pfeile). Die Akkumulationen von Aktin-RFP im Zellsoma verändern sich während der zweiten Translokation von einer starken Kondensation im Initialsegment des Fortsatzes zu mehreren punktuellen Anhäufungen sowohl an den Seiten als auch am hinteren und vorderen Ende des Zellsoma (Abb. 9B Bilder 40' - 76' Pfeilspitzen). Die Aufnahmen verdeutlichen, dass es während der Migration kortikaler Interneurone zu einer ständigen Fluktuation des Aktin-Zytoskeletts kommt, die vor allem in den Spitzen der Fortsätze und Bereichen des Zellsoma zu beobachten ist, wo DISC1 ebenfalls exprimiert ist (vgl. Abb. 7A). Überraschender Weise steht die dynamische Beobachtung dieser Zelle, bei der Aktin-Kondensationen im Zellsoma eher am Initialsegment des Fortsatzes auftreten, im Widerspruch zur statischen Beobachtung, bei der fAktin mit Phalloidin markiert wurde und das Signal hinter dem Zellkern auftrat (vgl. Abb. 8).

Anschließend sollte untersucht werden, ob das DISC1-Protein während der Migration seine intrazelluläre Position verändert und gegebenenfalls gehäuft in den Regionen vorkommt, in denen gerade eine Aktin-Kondensation stattfindet. Dafür wurden Zellen der MGE mit pDISC1-RFP-C1, einem Konstrukt, was ein DISC1-RFP-Fusionsprotein kodiert, transfiziert und auf einem kortikalen „feeder layer“ kultiviert. Wie bereits von Korth 2012 für andere Neurone beschrieben bildete das exogene DISC1-RFP-Fusionsprotein Aggresomen in den transfizierten Interneuronen und keine der beobachteten Zellen führte eine somale Translokation durch (Korth, 2012). Daher war es nicht möglich die intrazelluläre Dynamik von DISC1 zu untersuchen.

#### 4.2.2 DISC1 beeinflusst Mediatoren des Zytoskeletts und die Aktin-Reorganisation in Interneuronen

Im Folgenden sollte geklärt werden, inwiefern DISC1 die Expression oder die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Dazu wurde sich der RNA-Interferenz bedient. Zellen der MGE wurden mit Vektoren transfiziert, welche für miRNA kodieren, welche an die mRNA des Zielproteins bindet und so deren Abbau bewirkt. So war es möglich die mRNA von DISC1 und damit das DISC1-Protein in der Zelle zu verringern. Als Kontrolle diente ein Konstrukt, welches für eine miRNA kodiert, die mit keiner bekannten mRNA interferiert. Die Identifizierung transfizierter Zellen erfolgte über EmGFP als Reporterprotein, was von beiden Vektoren exprimiert wurde. Über die relative Fluoreszenzintensität nach einer Immunreaktion gegen DISC1 wurde ermittelt, wie stark die DISC1-miRNA das Proteinlevel in den Zellen der MGE verringerte. Wie in Abb. 10A und B dargestellt, war die relative Fluoreszenzintensität dieser Zellen um ca. 60% geringer als die von Interneuronen, welche mit Kontroll-miRNA-Konstrukten transfiziert waren (rel. Fluoreszenzintensität DISC1-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $0,48 \pm 0,05$ ; rel.



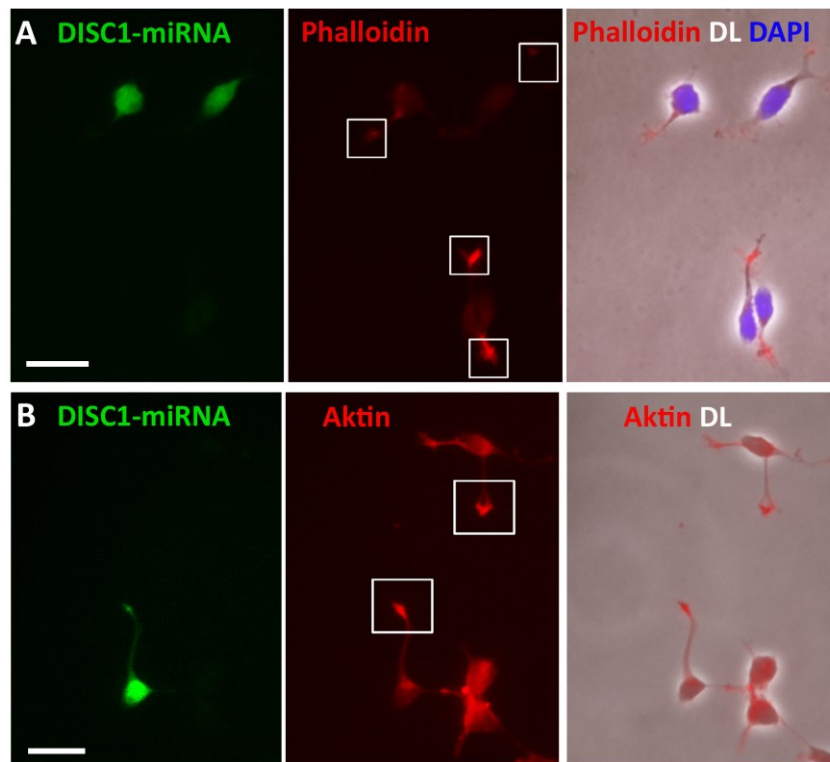
**Abb. 10: Interneurone, die mit DISC1-miRNA transfiziert wurden zeigen eine verringerte DISC1-Expression**

**(A)**, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von dissoziierten Zellen aus der MGE (E14,5), die mit pDISC1-miRNA-Konstrukten transfiziert und immunzytochemisch gegen DISC1 markiert wurden. Die transfizierte Zelle weist ein verringertes DISC1-Signal in der Immunzytochemie auf als das untransfizierte Neuron. Gestrichelte Linien weisen auf schwach erkennbare Zellen hin. Skalenbalken: 10 µm. **(B)**, Die Auswertung der relativen Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass Zellen, die mit DISC1

-miRNA transfiziert wurden weniger DISC1 Signal in der Immunzytochemie aufwiesen, als kontroll-transfizierte Zellen. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte. t-Test: \*\*\* p < 0,001.

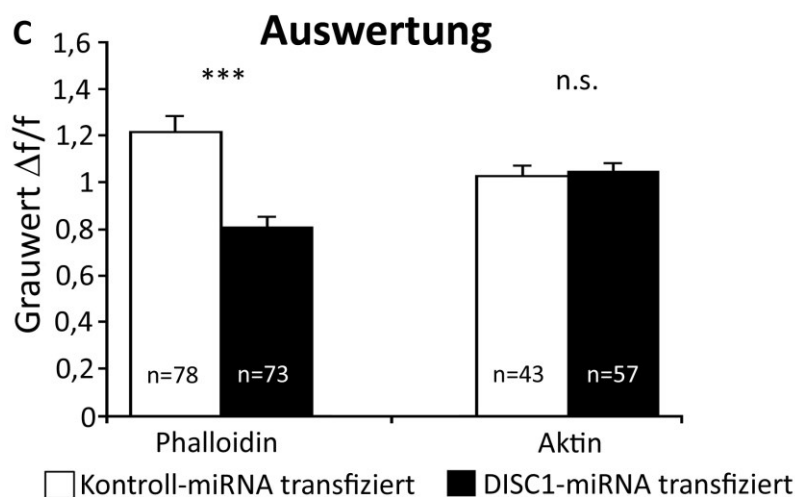


Fluoreszenzintensität kontrolltransfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $1,11 \pm 0,07$ ; t-Test:  $p < 0,001$ ). Mit Hilfe dieser Konstrukte war es möglich die Auswirkungen einer verringerten DISC1-Expression in Interneuronen zu untersuchen, was Aussagen über die



**Abb. 11: DISC1 beeinflusst die Bildung filamentösen Aktins in den Spitzen der Fortsätze kortikaler Interneurone**

(A, B), Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DISC1-miRNA-transfizierter und nicht transfizierter Interneurone, die mit Phalloidin (A) und Aktin-Antikörpern (B) markiert wurden. Skalenbalken: 20  $\mu$ m. Quadrate repräsentieren die Spitzen der Fortsätze. (C), Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass DISC1-miRNA-transfizierte Zellen weniger Phalloidin-Signal aufwiesen, aber das Aktin-Signal unverändert blieb. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte. t Test: n.s.  $p \geq 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$



Funktion von DISC1 in Interneuronen ermöglicht.

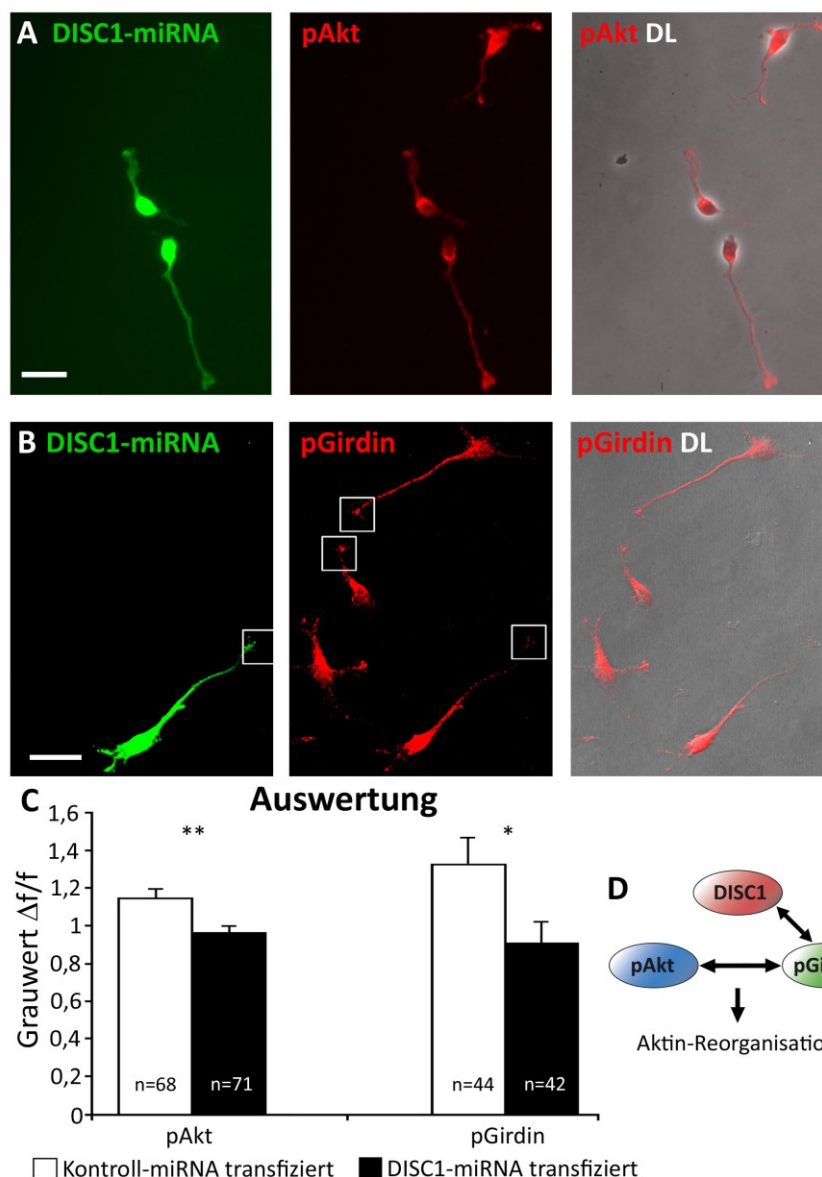
Um die Auswirkungen einer verringerten DISC1-Expression auf das Aktin-Zytoskelett zu überprüfen wurden Zellen der MGE (E14,5) wie unter 4.2.1 beschrieben mit DISC1-miRNA- oder Kontroll-miRNA-Konstrukten transfiziert und 36 h kultiviert. Zunächst wurde eine Phalloidinfärbung durchgeführt und die Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Es stellte sich heraus, dass DISC1-defiziente Zellen ein geringeres Phalloidin-Signal in

den Spitzen der Fortsätze aufwiesen als kontroll-transfizierte Zellen (Abb. 11A, C; rel. Fluoreszenzintensität kontroll-miRNA-transfizierte/nicht transfizierte Zellen:  $1,21 \pm 0,07$ ; rel. Fluoreszenzintensität DISC1-miRNA-transfizierte/nicht transfizierte Zellen:  $0,81 \pm 0,04$ ; t Test:  $p < 0,001$ ). Diese Resultate deuten darauf hin, dass im Bereich des Fortsatzes, wo das DISC1-Protein normalerweise lokalisiert ist (vgl. Abb. 7C), weniger fAktin vorliegt, wenn DISC1 in den Zellen herunterreguliert wird. Dass dies nicht das Resultat einer verminderten Expression des gesamten Aktins war, konnte mit Immunreaktionen gegen Aktin sichergestellt werden. Der verwendete Antikörper bindet sowohl filamentöses als auch monomeres Aktin, d.h. erfasst die Gesamtheit des Aktin-Zytoskeletts. Wie in Abb. 11B und C dargestellt bleibt die Fluoreszenzintensität des gAktin-Signals nach der Transfektion mit DISC1-miRNA-Konstrukten im Vergleich zu kontroll-transfizierten Neuronen unverändert (Abb. 11B, C; rel. Fluoreszenzintensität kontroll-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $1,03 \pm 0,05$ ; rel. Fluoreszenzintensität DISC1-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $1,05 \pm 0,04$ ; t Test:  $p \geq 0,05$ ). Folglich verändert die Herunterregulation von DISC1 nicht die Expression von Aktin-Monomeren, sondern die Bildung von fAktin aus den Aktin-Monomeren – die sogenannte Aktinnukleation.

Da DISC1 selbst bisher nicht als direkter Mediator des Aktin-Zytoskeletts beschrieben wurde, sollten im Folgenden Mediatoren des Aktin-Zytoskeletts untersucht werden, welche zusätzlich mit DISC1 interagieren können. Akt (auch als PKB – Proteinkinase B bezeichnet) und Girdin („girders of actin filaments“) sind während der embryonalen Entwicklung des Gehirns in Interneuronen exprimiert und es gibt Evidenzen dafür, dass sie sich sowohl gegenseitig beeinflussen als auch mit DISC1 im Zusammenhang stehen (Enomoto et al., 2009; Kim et al., 2009). Um zu untersuchen inwieweit das Herunterregulieren von DISC1 Einfluss auf diese Aktin-Mediatoren nimmt, wurden an miRNA-transfizierte Zellen der MGE Immunreaktionen gegen die phosphorylierten, d.h. aktivierten Proteine durchgeführt. In Interneuronen, die mit DISC1-miRNA-Konstrukten transfiziert waren, konnte ein verringertes pAkt-Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Abb. 12A, C; rel. Fluoreszenzintensität kontroll-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $1,15 \pm 0,05$ ; rel. Fluoreszenzintensität DISC1-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $0,97 \pm 0,03$ ; t Test:  $p < 0,01$ ). Dies deutet darauf hin, dass DISC1 die Aktivität von Akt in Interneuronen beeinflusst. Bei den Immunreaktionen gegen pGirdin zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal in den Spitzen der Fortsätze verringert war (Abb. 12B, C; rel. Fluoreszenzintensität kontroll-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zel-

len:  $1,32 \pm 0,15$ ; rel. Fluoreszenzintensität DISC1-miRNA-transfizierte/nicht-transfizierte Zellen:  $0,91 \pm 0,11$ ; t Test:  $p < 0,05$ ). Die lokal begrenzte Verringerung der Girdin-Aktivität könnte ein Hinweis darauf sein, dass DISC1 nicht direkt die Aktivität von Girdin beeinflussen kann, sondern beispielsweise die Lokalisation des aktivierten Proteins in den Fortsatzspitzen sicherstellt.

Zusammenfassend geht aus diesen Experimenten hervor, dass die Herunterregulierung von DISC1 zu einer fehlerhaften Aktin-Reorganisation in den Fortsatzspitzen der Interneurone führt. Dass die Aktivität der Aktin-Mediatoren Akt und Girdin in diesen Zellen verändert ist, suggeriert, dass DISC1 über diese Faktoren die Aktin-Reorganisation beeinflussen könnte. Da bereits beschrieben wurde, dass DISC1 mit Akt und Girdin interagieren und auch deren Interaktion beeinflussen kann, liegt es nahe, dass die korrekte Balance von Expression, Aktivität und Lokalisation aller drei Faktoren für die fehlerfreie Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts notwendig ist (Abb. 12D).



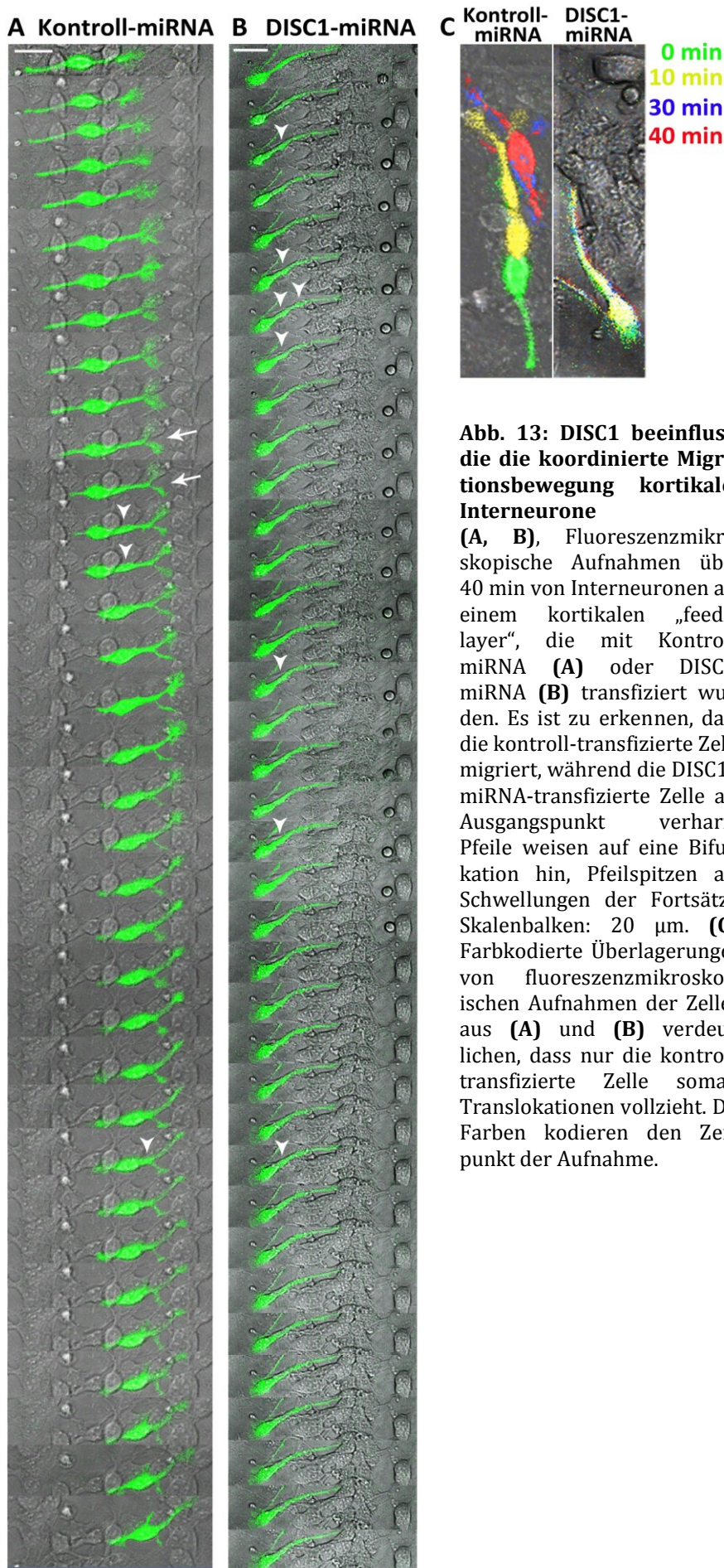


### 4.3 Das Herunterregulieren von DISC1 führt zu einem Migrationsdefekt kortikaler Interneurone *in vitro*

Die bisher beschriebenen Experimente zeigen, dass DISC1 während der Entwicklung des Gehirns der Maus Einfluss auf das Zytoskelett kortikaler Interneurone hat. Eine korrekte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist entscheidend für die korrekte Migration von Nervenzellen (He et al., 2010). Dies suggeriert, dass DISC1 ebenfalls einen Einfluss auf die Migration neuronaler Zellen – insbesondere kortikaler Interneurone – hat, was im Folgenden untersucht werden soll.

#### 4.3.1 Der Einfluss von DISC1 auf die Anzahl somaler Translokationen und die Geschwindigkeit kortikaler Interneurone

Zunächst sollte die Auswirkung einer verminderten DISC1-Expression auf den Migrationsmodus kortikaler Interneurone untersucht werden. Diese neuronalen Zellen vollziehen eine saltatorische Bewegung mit einer Zykluslänge von ca. 20 min, wobei mit Hilfe des bifurkalen Fortsatzes die Umgebung nach Lenkungsfaktoren abgetastet wird und der Fortsatz, welcher repulsiven Faktoren zugewandt ist, eingezogen wird. Laut Modellvorstellung folgt nun das Soma mit dem Kern in eine zuvor entstandene Schwellung im Fortsatz, welche direkt hinter der Bifurkation entsteht. Nun bildet sich die nächste Bifurkation, welche die Umgebung erneut abtastet. (Martini et al., 2009) Dieses Szenario kann am deutlichsten mit Hilfe des „feeder layer“- Experiments beobachtet werden, da die Interneurone hier eine zwei-dimensionale Migration aufweisen. Es wurden Interneurone des Embryonaltags E14,5 durch *ex utero* Elektroporation mit DISC1-miRNA- oder Kontroll-miRNA-Konstrukten wie unter 4.2.1 beschrieben transfiziert und auf einem kortikalen „feeder layer“ untransfizierter kortikaler Zellen derselben Embryonen kultiviert. Nach 36 h wurden diese für Zeitrafferaufnahmen mit einem Lasermikroskop in Kombination mit einem Zellkulturinkubator herangezogen. Da die transfizierten Zellen EmGFP als Reporter exprimierten, war es möglich diese sowohl von untransfizierten Interneuronen als auch von kortikalen Zellen des „feeder layer“ zu unterscheiden und bis in ihre Fortsätze zu beobachten.



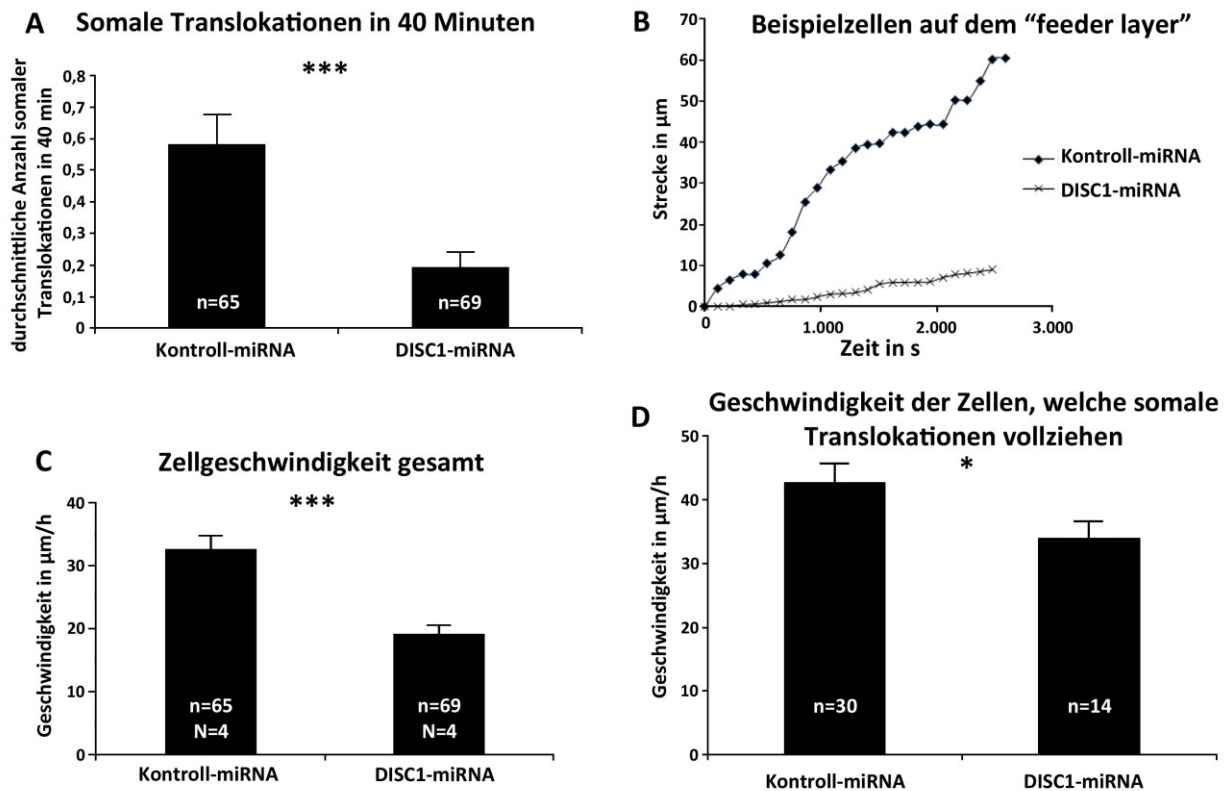
Da die Interneurone durch den Fluoreszenzvorgang oxidativem Stress ausgesetzt sind, wurden die Beobachtungen der einzelnen Zellen auf 40 min beschränkt. In dieser Zeit vollziehen Interneurone im Mittel zwei saltatorische Bewegungen mit drei somalen Translokationen. In Abb. 13A ist zu erkennen, dass eine kontroll-transfizierte Zelle sich wie bereits beschrieben fortbewegt. Es kommt zu einer Bifurkation des Fortsatzes, wovon ein Ast wieder eingezogen wird (Abb. 13A Pfeile). Kurz bevor das Soma mit dem Kern nach vorn springt entsteht hinter der Bifurkation eine Schwellung (Abb. 13A Pfeilspitzen), in die der Kern bewegt wird. In dieser Zelle ist auch

ein hängender Fortsatz zu beobachten, was typisch für die saltatorische Bewegung dieser Neuronen ist (Metin et al., 2006). In Abb. 13B ist im Vergleich dazu eine 40 minütige Zeitreihe eines Interneurons gezeigt, welches mit DISC1-miRNA-Konstrukten transfiziert wurde. Es ist zu beobachten, dass diese Nervenzelle keinerlei Translokationen vollzieht und auf der Stelle verharret. In dieser Zelle sind aber wie unter Kontrollbedingungen immer wieder Schwellungen im Fortsatz zu erkennen, in die der Kern hier aber nicht bewegt wird (Abb. 13B Pfeilspitzen). Dass die Fortsätze der Zelle motil waren und über den Verlauf der Beobachtung nicht eingezogen wurden, deutet darauf hin, dass die Zelle keine Apoptose einleitete. In Abb. 13C sind die transfizierten Zellen noch einmal zeitlich farbkodiert gegenübergestellt.

Die Auswertung dieser Experimente ergab, dass Interneurone, in denen weniger DISC1 vorhanden war, seltener migrierten und weniger somale Translokationen vollzogen. Von kontroll-transfizierten Zellen führten 46,2% eine bis maximal drei Translokationen durch. Dies entspricht im Mittel  $0,58 \pm 0,09$  somalen Translokationen pro Zelle innerhalb der 40 minütigen Beobachtungszeiten. Bei den DISC1-miRNA-transfizierten Zellen zeigten nur 20,3% der Interneurone ein bis maximal zwei somale Translokationen in 40 min, womit sie sich im Mittel mit  $0,19 \pm 0,15$  somalen Translokationen pro Zelle signifikant von den kontroll-transfizierten Zellen unterschieden (t Test:  $p < 0,001$ ; Abb. 14A). Des Weiteren wurden die zurückgelegten Strecken der Interneurone auf dem kortikalen „feeder layer“ innerhalb der 40 min gemessen. Beim Auftragen der zurückgelegten Strecke über die Zeit sind ebenfalls sprunghafte Translokationen in einigen kontroll-transfizierten Zellen zu erkennen, wohingegen die meisten DISC1-miRNA-transfizierten Zellen nur minimale Bewegungen aufwiesen (Abb. 14B). Mit der zurückgelegten Strecke der Interneurone über die Zeit wurde auf die Geschwindigkeit der Zellen insgesamt geschlossen (Abb. 14C). Dabei ergab sich, dass kontroll-transfizierte Zellen durchschnittlich eine Geschwindigkeit von  $32 \pm 2 \mu\text{m/h}$  aufwiesen und DISC1-miRNA-transfizierte Neurone mit einer Geschwindigkeit von  $19 \pm 1 \mu\text{m/h}$  auf dem „feeder layer“ migrierten (t Test:  $p < 0,001$ ; Abb. 14C). Somit vollziehen DISC1-miRNA-transfizierte Interneurone ca. 60% weniger somale Translokationen als kontroll-transfizierte Zellen und migrieren folglich mehr als 30% langsamer.

Da in diesen Experimenten mehr kontroll-transfizierte als DISC1-miRNA-transfizierte Zellen somale Translokationen aufwiesen, stellte sich die Frage, ob es einen Geschwindigkeitsunterschied zwischen denjenigen Interneuronen gibt, die tatsächlich migrierten, d.h. mindestens eine somale Translokation innerhalb der 40 min vollzogen. Während

kontroll-transfizierte Interneurone mit einer Geschwindigkeit von  $42 \pm 3 \mu\text{m/h}$  migrierten, bewegten sich die Zellen, in denen weniger DISC1 vorhanden war, mit einer Geschwindigkeit von nur  $34 \pm 3 \mu\text{m/h}$  signifikant langsamer fort (t Test:  $p < 0,05$ ; Abb. 14D). Ist das DISC1-Level in Interneuronen verringert, so führen diese nicht nur weniger Translokationen durch, sondern benötigen dafür auch mehr Zeit als kontroll-transfizierte Zellen.



**Abb. 14: Quantifizierung der „feeder layer“ Experimente**

(A), Die Quantifizierung der Anzahl somaler Translokationen ergab, dass DISC1-miRNA-transfizierte Zellen in 40 min weniger Translokationen vollziehen als kontroll-transfizierte Interneurone. (B), Die Auswertung der zurückgelegten Strecken der Interneurone zeigt einen typischen saltatorischen Verlauf bei kontroll-transfizierten, nicht aber bei DISC1-miRNA-transfizierten Neuronen. (C), Die Gesamtgeschwindigkeit der kontroll-transfizierten Zellen war signifikant höher als die der DISC1-miRNA-transfizierten Neurone. (D), Zog man ausschließlich Zellen zur Auswertung heran, die mindestens eine somale Translokation aufwiesen, waren auch hier die kontroll-transfizierten Zellen signifikant schneller als die DISC1-miRNA-transfizierten Interneurone. Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar. tTest: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . „n“ stellt die Anzahl der Interneurone dar.

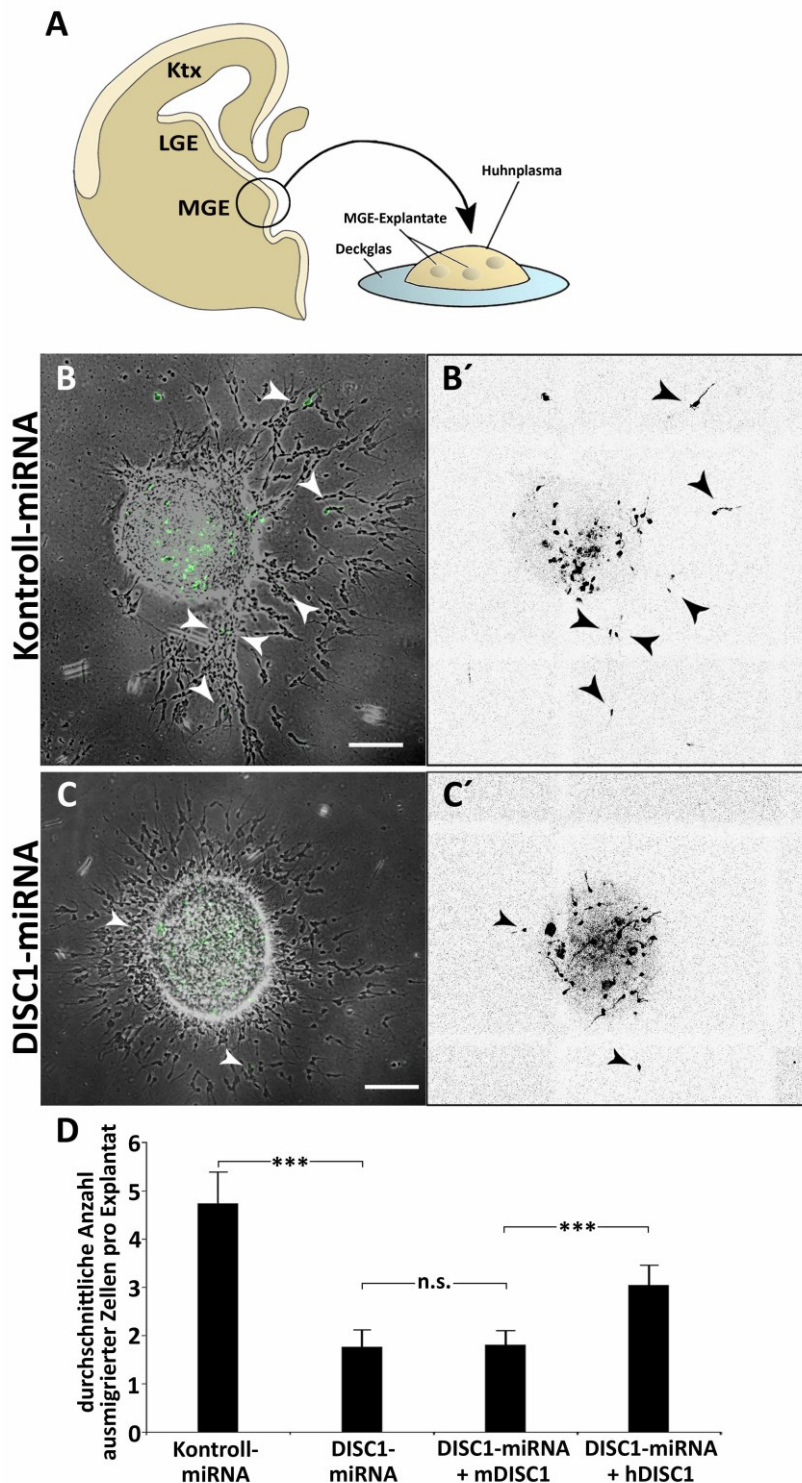
Diese Experimente zeigen, dass ein Herunterregulieren von DISC1 in Interneuronen zu einem Migrationsdefekt führt, welcher es den Zellen erschwert somale Translokationen auszuführen und was somit eine Verringerung der Geschwindigkeit nach sich zieht. Da die Interneurone auf dem kortikalen „feeder layer“ eine artifizielle zwei-dimensionale Migration vollziehen, war es nun von Interesse das Migrationsverhalten dieser Zellen

abhängig von der DISC1-Expression in einem drei-dimensionalen Substrat zu untersuchen, wie es im sich entwickelnden Gehirn der Fall ist.

#### 4.3.2 *DISC1 ist notwendig für die korrekte Migration kortikaler Interneurone im Plasmaclot*

Um die Migration kortikaler Interneurone in Abhängigkeit von DISC1 in einem drei-dimensionalen Substrat zu untersuchen fand der Plasmaclot Verwendung. Zunächst wurden dafür die Zellen der MGE von embryonalen Gehirnhemisphären (E14,5) durch *ex utero* Elektroporation wie unter 4.2.1 beschrieben mit miRNA-Konstrukten transfiziert. Nachdem die MGEs aus den Hemisphären präpariert waren, erfolgte nicht die Dissoziation in Einzelzellen, sondern wurden die MGE-Explantate mit Hilfe eines „tissue choppers“ in 200 x 200 µm große Stücke gehackt. Nachdem diese sich unter Kulturbedingungen abgerundet hatten, wurden sie in einen Tropfen aus Hühnerplasma überführt (schematisch dargestellt in Abb. 15A). Nach der Vernetzung des Plasmas durch Zugabe von Thrombin wurden die Plasmaclots zwei Tage kultiviert und anschließend die Anzahl der transfizierten Zellen, welche die Explantate verlassen hatten, ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur diejenigen Explantate für die Auswertung herangezogen wurden, in denen mindestens eine transfizierte Zelle vorlag, die das Explantat verlassen hatte. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Zellen der Explantate gesund waren und das Ausmigrieren prinzipiell möglich war. Die Auswertung ergab, dass mit  $1,8 \pm 0,6$  Zellen pro Explantat deutlich weniger Interneurone die Explantate verließen, wenn sie mit DISC1-miRNA transfiziert waren, als nach der Transfektion mit Kontrollkonstrukten, bei denen im Durchschnitt  $4,7 \pm 0,4$  Zellen ein Explantat verlassen hatten (DISC1-miRNA-transfizierte Explantate: n=82; kontroll-transfizierte Explantate: n=84; t Test  $p < 0,001$ ; Abb. 15B, C, D). Damit konnte gezeigt werden, dass Zellen, in denen DISC1 herunterreguliert wurde, auch in einem drei-dimensionalen Substrat einen Migrationsdefekt aufweisen, was konsistent mit den Ergebnissen des „feeder layer“-Experiments ist (vgl. 4.3.1).





**Abb. 15: DISC1 beeinflusst die Migration kortikaler Interneurone im Plasmaclot**

(A), Schematische Darstellung des Experiments. Transfizierte Explantate der MGE wurden in Huhnplasma auf einem Deckglas kultiviert um die Migration der Interneurone in Abhängigkeit von DISC1 in einem drei-dimensionalen Substrat zu untersuchen. (B, C), Mikroskopische Aufnahmen der Explantate nach zwei Tagen in Kultur zeigen ein coronales Auswandern der Zellen aus den Explantaten. Es ist zu erkennen, dass mehr kontroll-transfizierte Neurone das Explantat verlassen haben als DISC1-miRNA-transfizierte Zellen (Pfeilspitzen). (B', C'), Invertierte Fluoreszenzaufnahmen der Explantate aus B und C zur Verdeutlichung der transfizierten Zellen. Skaleneinheiten: 100 µm. (D), Die Auswertung der Anzahl transfizierter Zellen, die das Explantat verlassen haben, ergab, dass weniger DISC1-miRNA-transfizierte Interneurone als kontroll-transfizierte Zellen aus den Explantaten ausmigrierten. Wurden die Interneurone zusätzlich zu DISC1-miRNA mit Expressionskonstrukten für murines DISC1 (mDISC1) transfiziert migrierten ähnlich viele Zellen aus den Explantaten aus, wie nach Transfektion mit DISC1-miRNA allein. Hingegen kam es bei einer zusätzlichen Transfektion von humanem DISC1 (hDISC1) mit DISC1-miRNA zu einer erhöhten Anzahl ausmigrierter Zellen im Vergleich zu murinem DISC1 plus DISC1-miRNA. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte. t Test: n.s.  $p \geq 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Um nachzuweisen, dass es sich bei diesen Effekten tatsächlich um Auswirkungen durch das Fehlen von DISC1 handelt und nicht um „off-target-effects“, wurde ein sogenanntes „Rescue“-Experiment durchgeführt. Wenn der beobachtete Effekt nicht durch Wechselwirkungen des verwendeten Konstrukts mit anderen Proteinen und/oder zellulären Faktoren zustande gekommen ist, so kann dieser abgemildert oder wieder rückgängig gemacht werden, indem das verminderte DISC1-Level der Interneurone wieder

erhöht wird. Um dies zu testen, wurden die Zellen der MGE sowohl mit DISC1-miRNA-Konstrukten als auch DISC1-Expressionskonstrukten kotransfiziert. Als Kontrolle erfolgte zunächst eine exogene Expression von murinem DISC1 (mDISC1) mit DISC1-miRNA. Da die DISC1-miRNA mit muriner DISC1-mRNA interferiert, sollte sowohl die endogene als auch die exogene – auf dem Expressionskonstrukt kodierte – mRNA abgebaut werden und der Migrationsdefekt bestehen bleiben. Die Quantifizierung ergab, dass zwischen der Anzahl doppelt-transfizierter Interneurone außerhalb des Explantats und der Anzahl Zellen, die einzig mit DISC1-miRNA-Konstrukten transfiziert waren und aus den Explantaten ausmigriert waren, kein signifikanter Unterschied bestand (DISC1-miRNA-transfizierte Zellen außerhalb des Explantats:  $1,80 \pm 0,40$ ; DISC1-miRNA- + mDISC1-transfizierte Zellen außerhalb des Explantats:  $1,80 \pm 0,18$ ; t Test:  $p \geq 0,05$ , Abb. 15D). Wurden die Zellen dagegen neben der DISC1-miRNA zusätzlich mit einem Expressionskonstrukt für humanes DISC1 (hDISC1) transfiziert, dessen mRNA nicht mit der DISC1-miRNA interferiert, waren mit  $3,02 \pm 0,27$  ausmigrierten Interneuronen pro Explantat wesentlich mehr Zellen in der Lage die Explantate zu verlassen als nach Doppel-Transfektion mit DISC1-miRNA und mDISC1 (DISC1-miRNA- + mDISC1-transfizierte Zellen außerhalb des Explantats:  $1,80 \pm 0,18$ ; DISC1-miRNA- + hDISC1-transfizierte Zellen außerhalb des Explantats:  $3,02 \pm 0,27$ ; t Test:  $p < 0,001$ ; Abb. 15D). Dass die Expression einer miRNA-resistenten Form von DISC1 den Migrationsdefekt mindert, der durch das Herunterregulieren von endogenem DISC1 verursacht wurde, verdeutlicht, dass es sich bei dem hier dargestellten Effekt nicht um einen „off-target-effect“ handelt und das DISC1-Protein für die Migration kortikaler Interneurone notwendig ist.

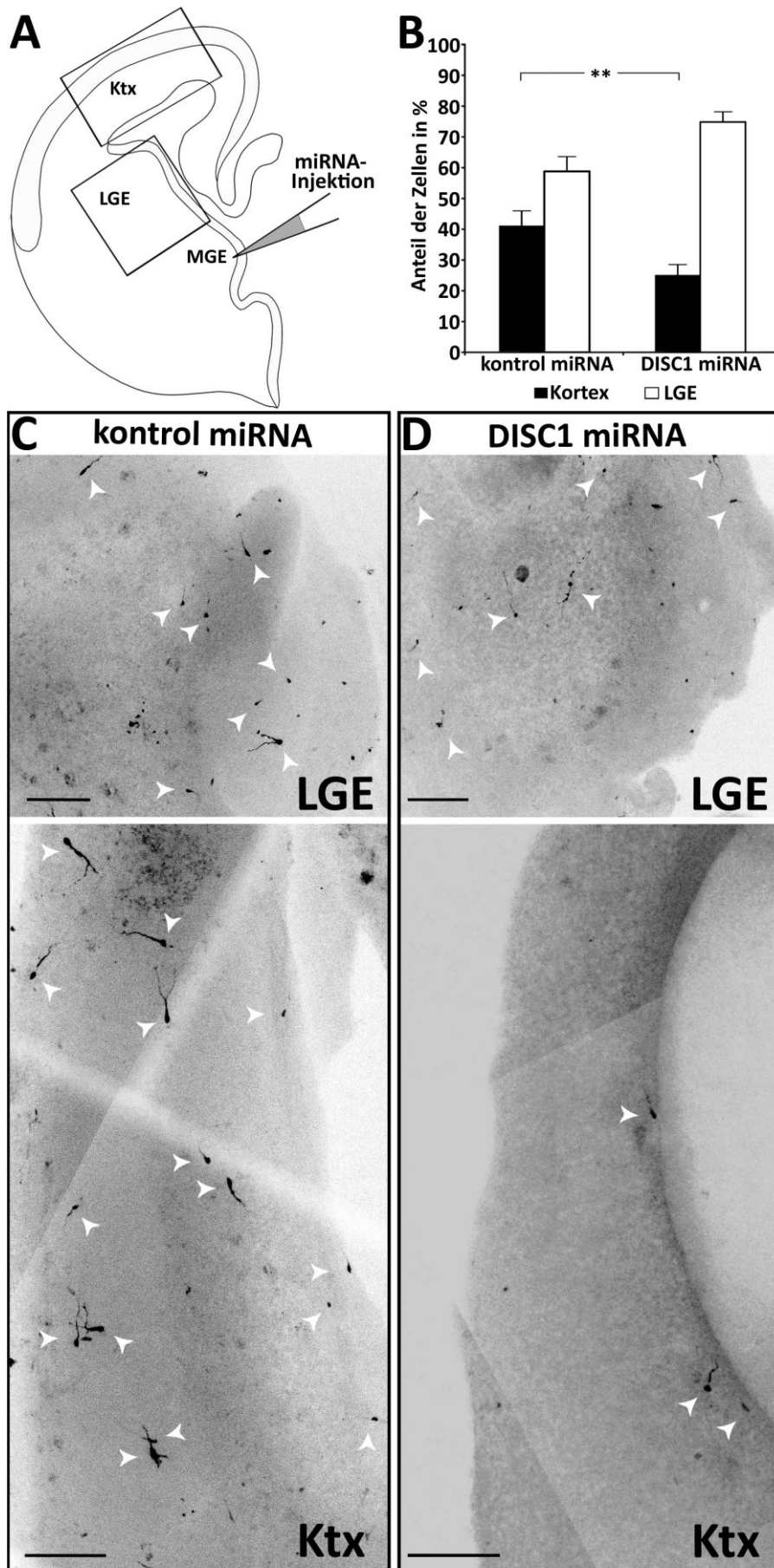
Da der Plasmaclot zwar eine drei-dimensionale Migration der Interneurone – ähnlich wie im sich entwickelnden Gehirn – gewährleistet, das Substrat allerdings artifiziell ist, war im Folgenden zu klären, ob das Herunterregulieren von DISC1 einen ähnlichen Effekt unter Bedingungen aufweist, welche der *in vivo* Situation ähnlicher sind.

### 4.3.3 Das Herunterregulieren von DISC1 führt zu einem Migrationsdefekt in Schnittkulturen

Im Folgenden sollte die Funktion von DISC1 während der Migration kortikaler Interneurone in Schnittkulturen untersucht werden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen *in vitro* Experimenten sind in Schnittkulturen die anatomischen und molekularen Gegebenheiten eher mit der *in vivo* Situation vergleichbar. So beeinflusst die Umgebung der Interneurone deren Migration, indem richtungweisende, segregierende oder geschwindigkeitsbeeinflussende Signale von benachbarten Zellen bzw. Arealen auf die wandernden Neurone übertragen werden (Rudolph et al., 2009; Zimmer et al., 2011; Steinecke, 2013)

Die Zellen der MGE wurden, wie unter 4.2.1 beschrieben, mit DISC1-miRNA- oder Kontroll-miRNA-Konstrukten transfiziert. Mit der Injektion eines Farbstoffes („fast green“) wurde sichergestellt, dass nur die MGE und keine benachbarten Bereiche getroffen wurden. Die so behandelten Hemisphären wurden in „low melt“ Agarose eingebettet und 250 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf Membranen an der Oberfläche des Medium schwimmend drei Tage kultiviert wurden. Die Schnitte, bei denen MGE und LGE klar durch einen Sulkus getrennt waren, wurden zur Auswertung herangezogen. Da die Identifikation einzelner Zellen aufgrund hoher Transfektionseffizienz in der MGE nicht möglich war, wurde die Anzahl der Neurone, welche in die LGE und in den Kortex migriert waren, ermittelt (schematische Darstellung in Abb. 16A). Die Gesamtzahl der Zellen wurde auf 100% gesetzt und das Verhältnis der Anteile von LGE und Kortex berechnet. In Abb. 16C und D sind invertierte Fluoreszenzaufnahmen der LGE und des Kortex von kontroll- und DISC1-miRNA-transfizierten Schnitten gezeigt. Es ist zu erkennen, dass deutlich weniger DISC1-miRNA-transfizierte Interneurone den Kortex erreichten als kontroll-transfizierte Interneurone (Abb. 16C, D; Pfeilspitzen). Nach der Transfektion mit Kontroll-miRNA migrierten 41% der Zellen bis in den Kortex, während 59% der Zellen in der LGE zu finden waren. Im Gegensatz dazu verblieben 75% der DISC1-miRNA-transfizierten Zellen in der LGE und nur 25% der Neurone erreichten den Kortex (kontroll-miRNA-transfizierte Zellen im Kortex:  $41,2 \pm 4,7\%$ ; DISC1-miRNA-transfizierte Zellen im Kortex:  $25,2 \pm 3,2\%$ ; t Test:  $p < 0,01$ ; Abb. 16B, C, D). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine verminderte Expression von DISC1 in Schnittkulturen die tangentielle Migration der Interneurone stark beeinträchtigt, was konsistent zu den Resultaten der vorangegangenen Experimente ist.





**Abb. 16 DISC1 beeinflusst die Migration kortikaler Interneurone in Schnittkulturen**

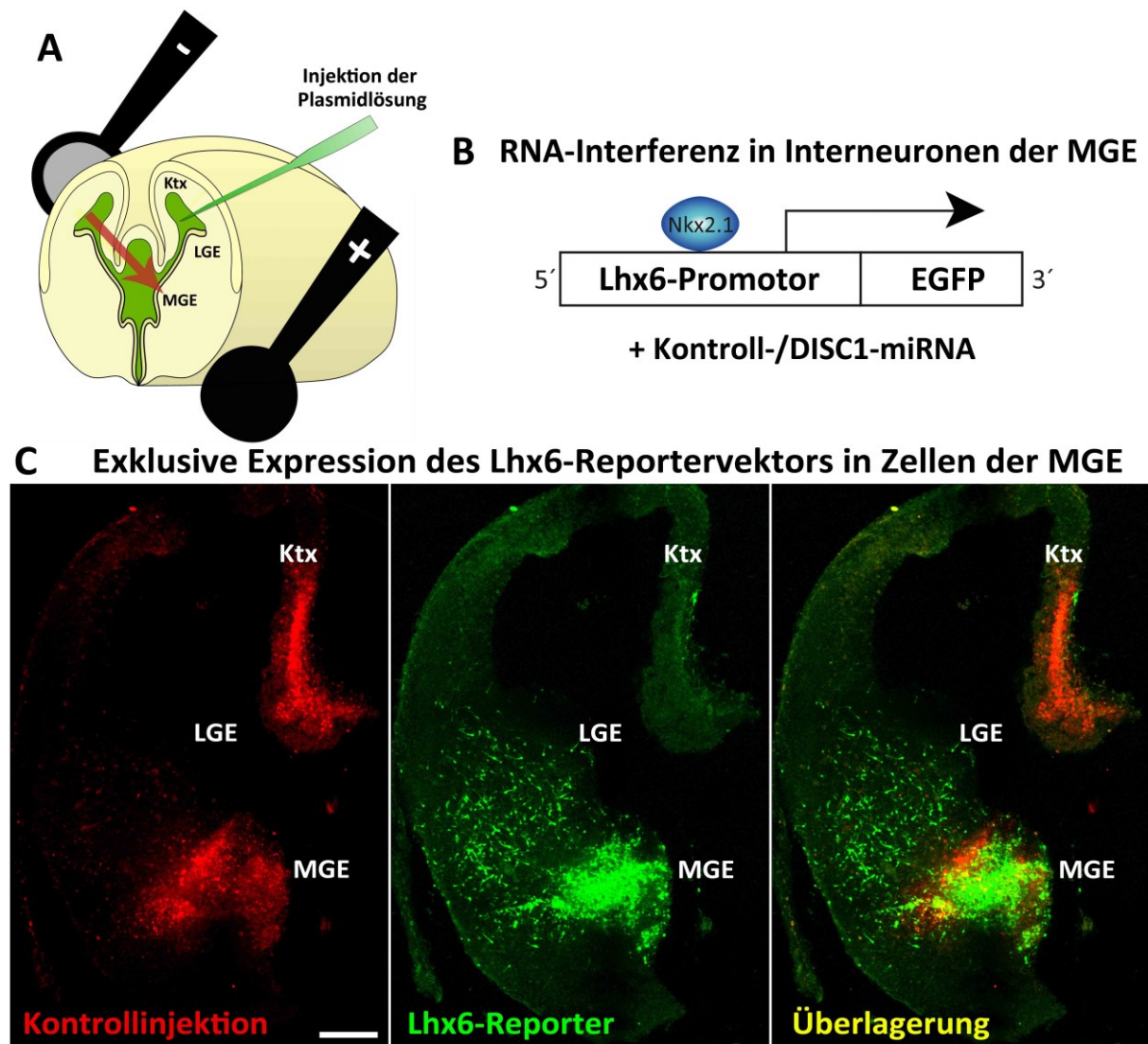
**(A)**, Schematische Darstellung des Experiments. Die Injektion der miRNA-Konstrukte erfolgte ausschließlich in der MGE der Hemisphären. Nach *ex utero* Elektroporation wurden Schnittkulturen hergestellt und drei Tage kultiviert. Transfizierte Zellen in der LGE (Quadrat) und im Kortex (Rechteck) wurden gezählt. **(B)**, Quantifizierung der Anzahl DISC1-miRNA-transfizierter und kontroll-transfizierter Interneurone in LGE und Kortex. Die Gesamtzahl wurde auf 100% gesetzt und die Anteile von LGE und Kortex prozentual ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte. *t* Test: \*\*  $p < 0,01$ . **(C, D)**, Invertierte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines kontroll-transfizierten Schnittes **(C)** und eines DISC1-miRNA-transfizierten Schnittes **(D)** nach drei Tagen in Kultur. Dargestellt sind Ausschnitte aus der LGE und des Kortex. Es ist zu erkennen, dass unter Kontrollbedingungen mehr transfizierte Zellen den Kortex der Schnitte erreichen als in Schnitten, deren Zellen in der MGE mit DISC1-miRNA transfiziert wurden (Pfeilspitzen). Skalenbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4 Die korrekte Expression von DISC1 ist essentiell für eine fehlerfreie tangential Migration kortikaler Interneurone *in vivo***

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass es nach der Herunterregulierung von DISC1 in kortikalen Interneuronen zu einem Migrationsdefekt *in vitro* kommt. Da die Kulturbedingungen *in vitro* immer anders sind als die Embryonalentwicklung im lebenden Organismus und es teilweise zu artifiziellen Resultaten kommt (Zimmer et al., 2008), sollten die bisherigen Ergebnisse *in vivo* reproduziert werden. Dies würde ausschließen, dass es sich bei den *in vitro* Daten um Artefakte handelt, und deren Relevanz im sich entwickelnden Embryo belegen.

Mit Hilfe der intrauterinen Operation sollten die MGEs von Mausembryonen mit den Konstrukten für die Kontroll- bzw. DISC1-miRNA transfiziert werden und nach drei Tagen *in utero* die Anzahl der Interneurone bestimmt werden, welche in die LGE und den Kortex migriert waren. Es ist bereits beschrieben, dass eine Transfektion von Zellen im basalen Telencephalon allein durch den Winkel der Elektroden während der Elektroporation gewährleistet werden kann. Hierfür muss der embryonale Kopf schräg von dorso-temporal (Minuspol) nach ventro-temporal (Pluspol) zwischen der Zangenelektrode, die an der Außenseite des Uterus angesetzt wird, zu liegen kommen und in dieser Position elektroporiert werden (Borrell et al., 2005; Abb. 17A). Allerdings war es mit dieser Methode nicht möglich ausschließlich die MGE der lebenden Embryonen reproduzierbar zu transfizieren, sondern es wurden ebenfalls Zellen anderer Regionen des basalen Telencephalons transfiziert. Da der Fokus der transfizierten Zellen nach drei Tagen *in utero* nicht mehr identifizierbar war, was ebenfalls bereits beschrieben wurde (Gelman et al., 2009), war es notwendig ausschließlich Zellen der MGE zu transfizieren, da eine ektopische Transfektion, beispielsweise der LGE oder des POA, zu falsch-positiven Resultaten geführt hätte. Es wurde demzufolge ein Ansatz gewählt, bei dem der Elektroporationsfokus nicht nur über die Art und Weise der Elektroporation bestimmt wird sondern zusätzlich durch einen molekularbiologischen Marker auf eine Zellpopulation beschränkt bleibt.

Um ausschließlich die Interneurone der MGE auf einen Migrationsdefekt zu untersuchen wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, dessen Aktivität auf Lhx6-positive Zellen beschränkt ist. Wie in Abb. 6E zu sehen ist, stellt Lhx6 einen Transkriptionsfaktor für



**Abb. 17: Mit Hilfe des Lhx6-Reportervektors können Interneurone aus der MGE markiert und deren Migration nach mehreren Tagen *in utero* untersucht werden**

**(A)**, Schematische Darstellung der *in utero* Elektroporation. Die Plasmidlösung wird in den Ventrikel des embryonalen Gehirns injiziert und mittels schräg angesetzter Zangenelektrode werden elektrische Pulse erzeugt, die das Gewebe der MGE elektroporieren. Die negativ geladene DNA wird durch das entstandene elektrische Feld in Richtung MGE beschleunigt (Pfeil) wodurch die Zellen transfiziert werden. **(B)**, Schema der Regulation des Lhx6-Reporters. Das Reporterkonstrukt wird ausschließlich in Interneuronen der MGE durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.1 aktiviert. Die Interneurone werden sowohl mit kontroll- oder DISC1-miRNA und dem Reporterkonstrukt transfiziert, so dass sichergestellt ist, dass ausschließlich Interneurone aus der MGE für die Auswertung herangezogen werden. **(C)**, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines embryonalen Gehirnschnittes, in dessen Kortex (Ktx) und MGE Alexa555-Farbstoff zusammen mit Lhx6-Reporter injiziert wurde. Nach Elektroporation und zwei Tagen in Kultur ist zu beobachten, dass ausschließlich Zellen der MGE transfiziert sind und in Richtung Kortex wandern. Skalenbalken: 200  $\mu$ m.

kortikale Interneurone dar, der am Embryonaltag E14,5 in der MGE und denjenigen Neuronen, die von ihr ausmigrieren, exprimiert ist. Zur Markierung genau dieser Zellen stand die Reporteraktivität, d.h. die Expression von GFP, unter der Kontrolle des Lhx6-Promoters, welcher durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.1 in postmitotischen Interneuronen der MGE aktiviert wird (Liodis et al., 2007; Seuntjens et al., 2009; Abb. 17B). Um zu überprüfen, ob das Reporterkonstrukt tatsächlich spezifisch exprimiert wird,

wurde eine *ex utero* Elektroporation an Hemisphären des Embryonaltages E14,5 durchgeführt. Dabei wurde das Konstrukt zusammen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Alexa555) in den Kortex und die MGE injiziert. Nach der Transfektion und der Herstellung von Schnittkulturen (vgl. 4.3.3) folgte die Inkubation für zwei Tage unter Kulturbedingungen.

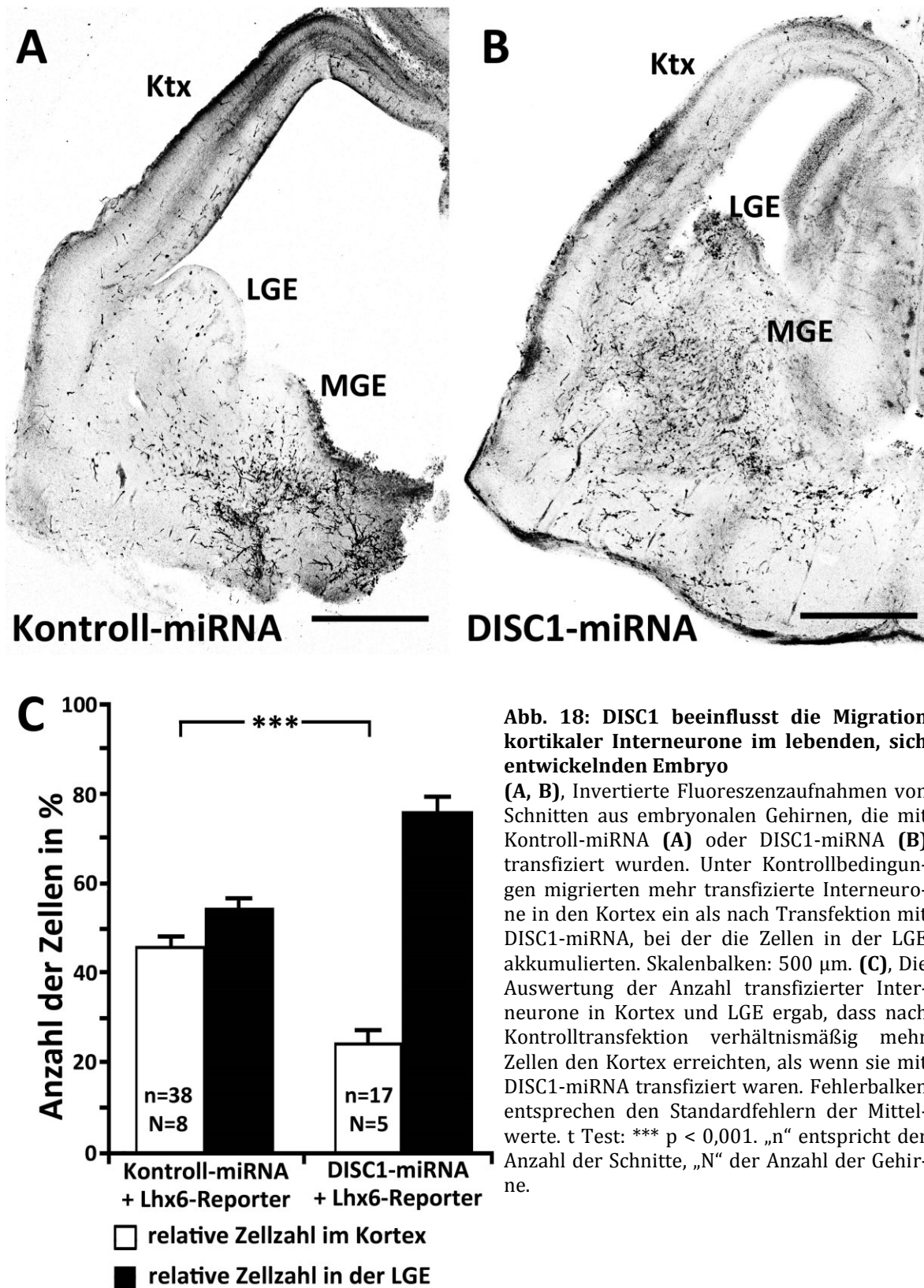
In Abb. 17C sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Schnittes mit transfizierten Zellen gezeigt. In Rot sind die Injektionsstellen des Farbstoffes mit dem Reporterkonstrukt sowohl im Kortex als auch in der MGE zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind grüne Zellen ausschließlich im basalen Telencephalon mit einem Fokus in der MGE zu beobachten. Dies bedeutet, dass das Lhx6-Reporterkonstrukt spezifisch in Interneuronen aus der MGE exprimiert wird, da zu diesem Entwicklungszeitpunkt der Transkriptionsfaktor Nkx2.1 in dieser Region exprimiert ist und die Transkription von Lhx6 aktiviert (Abb. 17B). An der kortikalen Injektionsstelle ist hingegen kein EGFP-Signal zu beobachten, was zu erwarten war, da hier Nkx2.1 an diesem Embryonalstadium nicht exprimiert ist und somit die Transkription von Lhx6 nicht initiieren kann. Das Reporterkonstrukt eignet sich somit migrierende Interneurone aus der MGE molekularbiologisch zu markieren und wurde folglich bei der in der *in utero* Elektroporation eingesetzt.

Nun erfolgte die Durchführung der intrauterinen Operation mit der Injektion der DNA-Lösung in die Ventrikel der Embryonen und der Elektroporation mit schräg angesetzter Zangenelektrode, wie in Abb. 17A schematisch dargestellt. In der CB-immunhistochemischen Markierung (Abb. 6E) ist erkennbar, dass am Embryonaltag E14,5 bereits viele Interneurone aus der MGE ausmigriert sind und in Richtung Kortex wandern. Um die Migration dieser Zellen, wie in den *in vitro* Experimenten, ab diesem Zeitpunkt zu untersuchen, musste die *in utero* Elektroporation bereits am Embryonaltag E13,5 durchgeführt werden. Da die Injektion der Plasmidlösung in den Ventrikel erfolgt, werden ausschließlich die Zellen der Ventrikularzone transfiziert. Diese befinden sich jedoch im Zellzyklus und beginnen mit der Migration erst, nachdem sie aus dem Zellzyklus ausgetreten sind. Da zu Beginn der Migration über Nkx2.1 die Expression von Lhx6 startet, wird ab diesem Zeitpunkt auch erst das GFP des Reporter-Konstrukts exprimiert. Um sicherzustellen, dass Interneurone, welche mit dem Reporterkonstrukt transfiziert waren, auch DISC1- oder Kontroll-miRNA-Vektoren enthielten, wurde das Lhx6-Reporterkonstrukt in einem Verhältnis von 1:4 mit DISC1- bzw. Kontroll-miRNA-Konstrukten koelektroporiert. Nach drei Tagen *in utero* wurden die embryonalen Gehirne entnommen, fixiert und Vibratomschnitte angefertigt. Es folgte eine Immunreaktion

gegen GFP, um auch schwach transfizierte Zellen zur Auswertung heranzuziehen. In Abb. 18A und B sind invertierte Fluoreszenzaufnahmen von Vibratomschnitten aus embryonalen Gehirnen gezeigt, die mit Kontroll- oder DISC1-miRNA plus Lhx6-Reporterkonstrukten *in utero* elektroporiert wurden. Es ist zu erkennen, dass unter Kontrollbedingungen mehr transfizierte Interneurone den Kortex erreichten als nach Transfektion mit DISC1-miRNA, bei der die transfizierten Zellen gehäuft in der LGE verblieben. Die Anzahl der Zellen in Kortex und LGE wurde auf 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der Zellen in Kortex und LGE berechnet. Dies ergab, dass unter Kontrollbedingungen nahezu doppelt so viele transfizierte Interneurone den Kortex erreichten wie nach Transfektion mit DISC1-miRNA (kontroll-transfizierte Zellen im Kortex:  $45,7 \pm 2,4\%$ ; DISC1-miRNA-transfizierte Zellen im Kortex:  $24,0 \pm 3,4\%$ ; t Test:  $p < 0,001$ ; Abb. 18C). Damit konnte der zuvor *in vitro* beschriebene Migrationsdefekt nach Herunterregulation von DISC1 mittels *in utero* Elektroporation im lebenden Embryo reproduziert werden. Die Zahlenverhältnisse der Interneurone im Kortex und in der LGE waren mit denen der Schnittkulturen vergleichbar, was darauf hindeutet, dass die Bedingungen *in vitro* ähnlich zu denen *in vivo* waren (vgl. Abschnitt 4.3.3 und Abb. 16).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass DISC1 einen Einfluss auf die korrekte tangentielle Migration kortikaler Interneurone in der Maus hat. Das Herunterregulieren dieses Gens führt zu Veränderungen in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts kultivierter Interneurone und zu Migrationsdefiziten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Damit könnten Veränderungen in der Expression von DISC1 zur fehlerhaften Anzahl oder Komposition kortikaler GABAerger Interneurone im Kortex führen. Solche Dysfunktionen in lokalen GABAergen Netzwerken sind oft mit der Pathophysiologie von Schizophrenie in Zusammenhang gebracht worden (Benes and Berretta, 2001; Lewis et al., 2005). Die Befunde der vorliegenden Dissertation untermauern die These, dass Schizophrenie eine entwicklungsbiologische Krankheit ist, deren Entstehung zumindest partiell auf Defekte der neuronalen Integration zurückzuführen ist (Lewis and Levitt, 2002).

## In utero Elektroporation mit Lhx6-Reporter + Kontroll-/DISC1-miRNA



## 5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle des Gens „Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1) bei der Migration kortikaler Interneurone in der Maus untersucht. Dieses Risikogen für psychiatrische Erkrankungen wird am Embryonaltag E14,5 in der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) – dem Entstehungsort parvalbumin-erger und somatostatin-erger kortikaler Interneurone – transkribiert. Dies entspricht dem Entwicklungsstadium, an dem die meisten dieser Neurone geboren werden und anschließend in Richtung Kortex migrieren (Marin and Rubenstein, 2001; Wonders and Anderson, 2006). Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnte auch das DISC1-Protein an diesem Entwicklungsstadium in der MGE und auf dem Weg der Interneurone zum Kortex nachgewiesen werden. Des Weiteren stellte sich heraus, dass DISC1 mit interneuronenspezifischen Genen, wie *Lhx6* – einem Homeoboxgen, welches in postmitotischen Interneuronen der MGE aktiviert ist (Liodis et al., 2007) – und Calbindin – einem weiteren molekularbiologischen Marker für Interneurone (Anderson et al., 1997; Zimmer et al., 2008) – auf zellulärer Ebene in diesen neuronalen Zellen koexprimiert ist.

Aus der experimentellen Untersuchung der Funktion von DISC1 in Interneuronen ging hervor, dass DISC1 essentiell für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie für die korrekte Migration dieser Neurone ist. Die Bildung filamentösen Aktins in den Fortsätzen der Interneurone ist von einer exakten DISC1-Expression abhängig, wobei DISC1 höchstwahrscheinlich nicht selbst auf die Reorganisation des Aktins Einfluss nimmt, sondern zwischengeschaltete Zytoskelett-Mediatoren beeinflusst. Diese Beobachtungen könnten die Ursache für den Migrationsdefekt darstellen, den ein Herunterregulieren von DISC1 in Interneuronen *in vitro* als auch *in vivo* nach sich zieht. Mit Hilfe verschiedener *in vitro* Experimente konnte nachgewiesen werden, dass DISC1 die Koordination der Migration kortikaler GABA-erger Zellen beeinflusst und somit notwendig für die korrekte Wanderung dieser Nervenzellen ist. Diese Ergebnisse konnten mittels intrauteriner Operation im lebenden Mausembryo reproduziert werden.



## 5.1 DISC1 ist für die korrekte Migration kortikaler Interneurone während der Entwicklung der Maus notwendig

Der sechsschichtige Kortex der Säugetiere beherbergt exzitatorische Pyramidenzellen und inhibitorische Interneurone, welche die funktionelle Grundlage sämtlicher Gehirnprozesse darstellen. Die richtige Balance zwischen Erregung und Hemmung ist für die Funktionsweise der Großhirnrinde entscheidend und geringe Veränderungen dieses Gleichgewichts können zu Erkrankungen wie Epilepsie, Autismus oder Schizophrenie führen. (Levitt, 2005a) Obwohl die Interneurone mit nur 20% der Zellen eine Minderheit der Neuronen darstellen, sind sie für die Funktionsweise des Kortex bedeutend. Sie werden während der Entwicklung der Maus im basalen Telencephalon geboren und wandern tangential zur Oberfläche des Gehirns in Richtung dorsales Telencephalon. Diese Migration ist – anders als die radiale Migration der Pyramidenzellen – unabhängig von radialer Glia und erfolgt auf Routen, welche durch Lenkungsmoleküle bestimmt werden (Wonders and Anderson, 2006). Verschiedene Familien dieser Lenkungsmoleküle, welche bei der Wegfindung von Axonen eine Funktion aufweisen, spielen auch bei der tangentialen Migration von Interneuronen eine entscheidende Rolle. Hier sind beispielsweise die Semaphorine zu nennen, die kortikale Interneurone vom entstehenden Striatum über Neuropilin-Rezeptoren fern halten. (Nobrega-Pereira et al., 2008) Die Familie der Ephrine beeinflusst die Migration der Interneurone auf verschiedene Weise, da sie sowohl Lenkungsfunktion aufweisen, indem sie die Interneurone von Nichtzielregionen fernhalten, wie z.B. der Ventrikularzone des basalen Telencephalons oder des Striatums, aber auch motogen auf die Interneurone wirken, indem sie den Stop striataler Interneurone triggern oder die Migration kortikaler Interneurone fördern (Zimmer et al., 2008; Rudolph et al., 2009; Steinecke, 2013).

Kortikale Interneurone weisen einen hohen Grad an Diversität auf. So werden über 20 verschiedene Subtypen von Interneuronen diskutiert, welche sowohl molekularbiologisch als auch funktionell – beispielsweise auf Grund unterschiedlicher Feuerungseigenschaften – unterschieden werden können, wobei die Nomenklatur und Anzahl der Interneurone noch Gegenstand aktueller Forschung ist (Butt et al., 2005; Defelipe et al., 2013). Diese unterschiedlichen Subtypen bilden inhibitorische Synapsen an verschiedenen Kompartimenten der Pyramidenzellen, was zu einer großen Diversität innerhalb der Morphologie dieser Zellen führt. So sind die Synapsen somatostatinerge Interneurone eher in den distalen Bereichen der Dendriten zu finden, während parvalbuminerge



Interneurone die somatische Inhibition der Pyramidenzellen sicherstellen (Markram et al., 2004). Diese Vielzahl an Subtypen innerhalb der kortikalen Interneurone wird durch transkriptionelle Kontrolle erreicht und durch den Entstehungsort und die Entstehungszeit bestimmt. Beispielsweise bringen die Lhx6-positiven Zellen der MGE am Embryonaltag E14,5 hauptsächlich somatostatinerge und parvalbuminerge Interneurone hervor, während die CGE bevorzugt Calretinin-positive Nervenzellen generiert (Yozu et al., 2005; Wonders and Anderson, 2006; Liodis et al., 2007). In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass kortikale Interneurone u.a. durch den Transkriptionsfaktor Sip1 spezifiziert werden, der dafür sorgt, dass die Interneurone so mit Lenkungsmolekülen ausgestattet werden, dass sie nicht ins Striatum einmigrieren, sondern weiter in Richtung dorsales Telencephalon wandern (McKinsey et al., 2013; van den Berghe et al., 2013). Dieser Transkriptionsfaktor reguliert wiederum nachgeschaltete Faktoren, wie Nkx2.1, der die Expression von Neuropilin-Rezeptoren unterdrückt, wodurch die Interneurone ins Striatum einwandern können (Nobrega-Pereira et al., 2008; Tomassy et al., 2013). Wird Sip1 ausgeschaltet, so kommen weniger Interneurone im Kortex an und migrieren vermehrt ins Striatum ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Migrationsdefekt kortikaler Interneurone beobachtet, wobei eine verringerte Anzahl Interneurone den Kortex erreichte, nachdem in diesen Zellen die DISC1-Expression verringert wurde. Dieser Migrationsdefekt stellt allerdings nicht die Folge falscher Lenkungsprozesse dar, sondern ist höchstwahrscheinlich das Resultat fehlerhafter intrazellulärer Prozesse, die für die korrekte Migration dieser Zellen entscheidend sind. Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass DISC1 Einfluss auf die neuronale Migration hat. Mit Hilfe der intrauterinen Operation konnte nachgewiesen werden, dass radial migrierende Vorläufer von Pyramidenzellen, welche mit DISC1-shRNA transfiziert waren, nicht korrekt in die kortikale Platte migrierten, sondern in der Intermediärzone des Kortex verblieben (Kamiya et al., 2005; Young-Pearse et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde bei neugeborenen Neuronen des adulten Hippocampus, bei denen DISC1 herunterreguliert war, eine Übermigration beobachtet (Duan et al., 2007; Enomoto et al., 2009; Kim et al., 2009). Dies legt keine direkte Einflussnahme von DISC1 auf die Migration, sondern eher einen Effekt auf die Positionierung der Neurone nahe (Duan et al., 2007). Eine andere Arbeit untermauert diese Interpretation mit dem Befund, dass die Injektion von NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu einem verringerten DISC1-Level in neugeborenen Granulazellen führt und es in Folge dessen zu einer Fehlpositionierung dieser Zellen kommt (Namba et al., 2011). Diese er-

höhte Migration wurde durch Transfektion dieser Zellen mit exogenem DISC1 aufgehoben, was zeigt, dass die neuronale Migration durch DISC1 beeinflusst wird und die DISC1-Expression durch extrazelluläre Signale gesteuert werden kann. In der vorliegenden Studie waren die Interneurone nach dem Herunterregulieren von DISC1 in der Lage bis in die LGE und zum Teil bis in den Kortex zu wandern (vgl. Abb. 16, Abb. 18). Allerdings migrierten weniger Zellen in den Kortex ein, wenn sie mit DISC1-miRNA transfiziert waren, als unter Kontrollbedingungen, was dafür spricht, dass DISC1 weniger für die Positionierung der Interneurone, sondern für die Migrationsfähigkeit dieser Nervenzellen per se notwendig ist.

Das Migrationsdefizit der Interneurone aus der MGE wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten, wie dem „feeder layer“-Experiment, dem Plasmaclot oder in der Schnittkultur, nachgewiesen. Die Herunterregulation von DISC1 führte in all diesen Experimenten zu einem Migrationsdefekt, der durch zusätzliche Transfektion mit exogenem DISC1, dessen Translation nicht durch RNA-Interferenz gehemmt wird, im Plasmaclotexperiment abgemildert werden konnte (vgl. Abb. 15). Dies bedeutet, dass es sich bei diesem Effekt von DISC1 nicht um einen sog. „off-target“-Effekt handelt, bei dem der Migrationsdefekt durch andere Komponenten hervorgerufen wird. Daraus folgt, dass DISC1 für die korrekte Migration der Interneurone *in vitro* notwendig ist.

Um die Auswirkungen einer verringerten DISC1-Expression in Interneuronen des lebenden Organismus zu erforschen wurde die intrauterine Operation herangezogen, bei welcher neuronale Zellen mit DNA-Konstrukten transfiziert werden können. Diese Methode findet häufig Anwendung bei Fragestellungen, welche die Entwicklung pyramidalearer Vorläuferzellen in Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen betreffen (Kamiya et al., 2005; Young-Pearse et al., 2010; Ishizuka et al., 2011; Taniguchi et al., 2012). Bei der intrauterinen Operation können Zellen raumzeitlich begrenzter Strukturen des Gehirns transfiziert werden, welche daraufhin über die Gesamtzeit der Entwicklung bis in den adulten Organismus beobachtet werden können. Diese Methode ruft – anders als beispielsweise eine Virusinjektion – keinerlei Immunreaktionen hervor und kann auf ein sehr kleines Areal begrenzt werden, so dass die untransfizierten Nachbarzellen als intrinsische Kontrollgruppe angesehen werden können. So wurde beschrieben, dass allein durch die Haltung der Zangenelektrode bei der Operation der Ort bestimmt werden kann, an welchem Zellen transfiziert werden, wie z.B. der Kortex, der Hippocampus oder das basale Telencephalon. (Borrell et al., 2005; Taniguchi et al., 2012) Für die Untersuchung einer verringerten DISC1-Expression in Interneuronen der

MGE war es entscheidend ausschließlich diese Struktur am Embryonaltag E14,5, dem Entstehungstag der meisten kortikalen Interneurone, zu treffen. Dies war allein mit der Haltung der Zangenelektrode nicht zu gewährleisten, da nach drei Tagen *in vivo* der Fokus der Elektroporation nicht mehr nachzuvollziehen war und es durch Transfektion anderer Areale zu falsch-positiven Ergebnissen kommen konnte, was ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Gelman et al., 2009).

Um dies zu umgehen und ausschließlich die Zellen der MGE in die Analyse der tangentialen Migration einzubeziehen wurden die Interneurone der MGE mit Hilfe der intrauterinen Operation zusätzlich molekularbiologisch markiert. Es wurden Reporterplasmide zusammen mit den DISC1- oder Kontroll-miRNA-Konstrukten transfiziert, die EGFP unter der Kontrolle des Lhx6-Promotors exprimieren, welcher ausschließlich in postmitotischen Zellen der MGE durch Nkx2.1 aktiviert wird (Du et al., 2008; Nobrega-Pereira et al., 2008). Da DISC1-miRNA und Reportervektor unter der Kontrolle verschiedener Promotoren stehen (DISC1-miRNA – PolymeraseII-Promotor, EGFP-Reporter – Lhx6-Promotor), werden diese in unterschiedlicher Weise reguliert. Während der PolymeraseII-Promotor in allen Zellen aktiviert wird, ist der Lhx6-Promotor, wie zuvor erwähnt, ausschließlich in Interneuronen aus der MGE aktiviert. Dies hat zur Folge, dass in einigen Zellen zwar die DISC1-miRNA gebildet wird, die Zellen aber kein EGFP herstellen, da Lhx6 nicht aktiviert ist, was z.B. in der Ventrikularzone des basalen Telencephalons der Fall ist. Da bereits beschrieben wurde, dass DISC1 auch Einfluss auf Proliferationsprozesse pyramidalen Vorläuferzellen hat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Herunterregulierung von DISC1 in Interneuronenvorläufern ebenfalls einen solchen Effekt nach sich zieht, was die Anzahl kortikaler Interneurone ebenfalls verringern könnte (Mao et al., 2009; Ishizuka et al., 2011). In zukünftigen Studien wäre es von Vorteil die miRNA ebenfalls unter die Kontrolle des Lhx6-Promotors zu klonieren, welcher dann ausschließlich in migrierenden postmitotischen Interneuronen der MGE aktiviert wird und nur dort die miRNA gebildet werden würde. Es wäre ebenfalls von großer Bedeutung die Rolle von DISC1 während der Proliferation der Interneurone in der MGE zu untersuchen, wobei man die Expression der miRNA auf proliferierende Zellen beschränken könnte, indem man die miRNA-Expression unter die Kontrolle des Nestin-Promotors stellt. Nestin stellt ein Intermediärfilament dar, welches in neuronalen Vorläuferzellen zu finden ist (Yaworsky and Kappen, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden miRNA-Konstrukte und Reportervektoren in einem Verhältnis von 4:1 eingesetzt, was dazu führt, dass Zellen, die das Reporterkonstrukt

exprimierten, höchstwahrscheinlich ebenfalls mit miRNA-Konstrukten transfiziert waren. So wurden ausschließlich Zellen ausgewertet, die das Reporterkonstrukt exprimierten und zumindest bis in die LGE migriert waren. Dadurch wurde sichergestellt, dass es sich bei den zur Auswertung herangezogenen Interneuronen um postmitotische Zellen handelte, welche in der Lage waren zumindest eine partielle Migration in Richtung Kortex zu vollziehen.

Der Befund, dass Interneurone, bei denen DISC1 herunterreguliert wurde, Migrationsverhalten aufweisen, ist konsistent mit den Resultaten der *in vitro* Experimente, die zeigten, dass diese Zellen zwar langsamer sind und weniger somale Translokationen vollziehen, sie aber per se migrieren konnten (vgl. Abb. 13 und Abb. 14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Koordination der Migration in Interneuronen mit verringerter DISC1-Expression gestört ist. Für die fehlerfreie Wanderung dieser Zellen ist eine Fülle von intrazellulären Prozessen von Bedeutung, die einer strikten Kontrolle unterliegen und zeitlich koordiniert ablaufen müssen, was im Folgenden näher beleuchtet wird.

Der Modus der Migration kortikaler Interneurone folgt einem Muster, das einer saltatorischen – also nicht gleichmäßigen – Bewegung entspricht. Migrierende Interneurone sind polarisierte Zellen, welche einen Führungsfortsatz aufweisen, der sich vor dem Soma mit dem Zellkern befindet. Dieser Fortsatz ist sehr motil und häufig bifurkal verzweigt, wobei die Enden axonalen Wachstumskegeln ähneln. Mit Hilfe dieser Struktur können die Interneurone Lenkungsmoleküle registrieren und auf diese reagieren, indem der Fortsatz, welcher beispielsweise einem repulsiven Signal ausgesetzt ist, eingezogen wird. Erst nachdem eine Richtungsentscheidung getroffen wurde, erfolgt die Translokation des Soma mit dem Zellkern. (Martini et al., 2009; Abb. 13A) Hinter der Bifurkation des Fortsatzes entsteht oftmals eine Schwellung, in die der Zellkern mit einer Geschwindigkeit von bis zu 130  $\mu\text{m}/\text{h}$  bewegt wird (Bellion et al., 2005; Abb. 14B). An der Stelle, wo sich der Kern befand, entsteht ein hängender Fortsatz, der im Laufe des nächsten Zyklus‘ eingezogen wird. Auf ihrem Weg in den sich entwickelnden Kortex sind Interneurone einer Vielzahl von Signalen ausgesetzt, welche integriert und verarbeitet werden müssen. Daraufhin muss der Migrationsmodus dieser Zellen stetig an neue Gegebenheiten angepasst werden. Intrazellulär vollziehen sich während dieser saltatorischen Bewegung Veränderungen des Zytoskeletts, welche koordiniert ablaufen, um die korrekte Migration dieser Zellen sicherzustellen. So wird das Zentrosom, welches sich vor dem Zellkern befindet und das zentrale MTOC („microtubule organization centre“ - zu Deutsch: Mikrotubuli organisierendes Zentrum) darstellt, in die Schwellung bewegt und

verankert, wonach der Zellkern wieder in Richtung des Zentrosoms wandert (Bellion et al., 2005; Baudoin et al., 2012). Des Weiteren finden Aktomyosinkontraktionen am hinteren Ende der Zellen statt, die für die Kerntranslokation entscheidend sind (Martini and Valdeolmillos, 2010). Die Koordination des Zytoskeletts während der Migration kortikaler Interneurone stellt eine korrekte Migration dieser Zellen von ihrem Entstehungsort zum Kortex sicher. Inwiefern DISC1 Einfluss auf Mediatoren dieser Strukturen hat, soll im Folgenden diskutiert werden. (Abb. 19 linker Teil)

## 5.2 DISC1 beeinflusst Mediatoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts in neuronalen Zellen

Essentielle Prozesse der Entwicklung des Gehirns, wie Zellproliferation, Zellmigration und die Ausbildung korrekter neuronaler Schaltkreise, sind letztlich auf die Reorganisation von Zytoskelettkomponenten zurückzuführen. An einige dieser Faktoren kann DISC1 binden und übt durch diese Interaktionen spezifische intrazelluläre Funktionen aus (Morris et al., 2003). Beispielsweise bindet DISC1 zentrosomale Proteine, wie Lis1 (lissencephali-1), Ndel1 (nuclear distribution protein 1), CAMDI (Coiled-coil protein associated with myosinII and DISC1) oder BBS1/4 (bardet-biedl-syndrome 1/4) und ist für die korrekte subzelluläre Lokalisation dieser Faktoren verantwortlich (Wang and Brandon, 2011). Die korrekte Lokalisation der zentrosomalen Proteine stellt die Funktion des Zentrosoms sicher und ist entscheidend für eine korrekte radiale Migration kortikaler Neurone im Neokortex (Higginbotham and Gleeson, 2007). Wird DISC1 in diesen Neuronen mittels *in utero* Elektroporation ausgeschaltet, ist eine Fehlpositionierung des Zentrosoms sowie eine Akkumulation der Mikrotubuli in der Peripherie von COS-7 Zellen zu beobachten, was ein Anzeichen für ein gestörtes Mikrotubuli-Zytoskelett darstellt. Dies trägt höchstwahrscheinlich zum Migrationsdefekt und dem verringerten Auswachsen der Dendriten dieser Neurone während der Entwicklung des Kortex bei (Kamiya et al., 2005).

Das Zentrosom stellt das zentrale Organell des Mikrotubuli-Zytoskeletts dar. In verschiedenen Arbeiten konnte beobachtet werden, dass Mikrotubuli ebenfalls entscheidend an der Migration neuronaler Zellen beteiligt sind. Diese stellen beispielsweise über den Faktor APC (*adenomatus poliposis coli*) eine Verbindung mit der Membran des Führungsfortsatzes sowie der extrazellulären Matrix her und dienen als Gegenkraft für die Zugkräfte am Kern. Werden solche Verbindungen nicht korrekt geknüpft, sind die Zellen

nicht mehr in der Lage nukleare Translokationen zu vollziehen. Es kommt zur Verlängerung des Fortsatzes, was konsistent mit den morphologischen Befunden von Interneuronen ist, bei denen DISC1 herunterreguliert wurde und die ebenfalls einen verlängerten, wenig-verzweigten Fortsatz aufweisen. (Asada and Sanada, 2010; Steinecke et al., 2012) Dies legt eine Rolle von DISC1 beim Prozess der APC-abhängigen Kopplung von Mikrotubuli an die Zellmembran nahe. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Verankerung von GSK3 $\beta$  abhängig ist, was einen zentralen Interaktionspartner von DISC1 darstellt (Mao et al., 2009). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Mikrotubuli eine käfigähnliche Struktur um den Kern von radial-migrierenden Neuronen bilden und der Kern mit Hilfe dieser Struktur entlang der Mikrotubuli bewegt wird. Die Kopplung des Kerns an die Mikrotubuli ist abhängig von Lis1, was als Bindungspartner von DISC1 auch hier eine Funktion dieses Proteins suggeriert (Rivas and Hatten, 1995; Tsai et al., 2007).

Neben seiner Funktion auf zentrosomale Proteine ist DISC1 mit weiteren Proteinen des Mikrotubuli-Zytoskeletts assoziiert, was durch einen „pull-down-assay“ herausgefunden wurde. Dabei identifizierte man Proteine, welche sowohl an die Mikrotubuli als auch an DISC1 gebunden waren, wie z.B. MAP1a (microtubule associated protein 1a) und MIPT3 (microtubule-interacting protein associated with TNF receptor associated factor 3) (Morris et al., 2003). MIPT3 wurde als intraflagellares Transportprotein beschrieben und ist synergistisch mit BBS4, einem anderen Interaktionspartner von DISC1, für die Entstehung des primären Ziliums verantwortlich (Li et al., 2008).

Das primäre Zilium ist entscheidend an der Regionalisierung des Gehirns, der embryonalen sowie der postnatalen Entwicklung und der adulten Neurogenese im Hippocampus beteiligt. Es koordiniert äußere Signale einiger Schlüsselsysteme und enthält z. B. Dopamin-, Serotonin- oder Somatostatinrezeptoren. Erkrankungen, bei denen das primäre Zilium betroffen ist, werden als Ziliopathien bezeichnet und haben häufig ähnliche Symptome, wie Gehirnmissbildungen oder kognitive Störungen. (Goetz and Anderson, 2010; Lee and Gleeson, 2010; Lancaster et al., 2011) In einer aktuellen Studie fanden Baudoin et al. 2012 heraus, dass auch migrierende Interneurone aus der MGE ein primäres Zilium aufweisen und dieses für die korrekte Migration der Interneurone mitverantwortlich ist. So integriert das Zilium Signale des „sonic-hedgehog“-Signalweges, was dafür sorgt, dass die Interneurone ihren tangentialen Weg verlassen und radial in den sich entwickelnden Kortex einwandern. Ein weiterer interessanter Befund dieser Studie weist darauf hin, dass es während des Migrationszyklus der Interneurone zu dynamischen Assoziationen der Mikrotubuli an das Zentrosom kommt. So wurde gezeigt, dass

das Zentrosom an die Plasmamembran gebunden ist, bevor der Kern nach vorn bewegt wird, und in dieser Phase sehr viele Mikrotubuli an das Zentrosom gebunden sind, welche die käfigartige Struktur um den Zellkern bilden. An der Position des Zentrosoms entstehen das primäre Zilium und die charakteristische Schwellung, in die der Kern bewegt wird. Die Verankerung des Zentrosoms könnte so eine weitere Gegenkraft zur Zugkraft des Kerns darstellen, welcher entlang der Mikrotubuli nach vorn bewegt wird. In der Phase, in der sich das Zentrosom in der zytoplasmatischen Region befindet und nicht an die Membran gebunden ist, sind weniger Mikrotubuli daran gebunden und es kann passiv entlang der extrazentrosomalen Mikrotubuli nach vorn bewegt werden. Dabei verschwindet das primäre Zilium oder es wird internalisiert. (Baudoin et al., 2012) Dies zeigt, dass die Entstehung des primären Ziliums dynamisch reguliert wird und direkt den Migrationsprozess kortikaler Interneurone beeinflusst. Eine Assoziation von DISC1 mit Mediatoren zur Entstehung des primären Ziliums (BBS4 und MIPT3) legt eine Funktion dieses Proteins bei der Migration kortikaler Interneurone nahe und ist folglich konsistent mit den Befunden der vorliegenden Dissertation.

Sowohl der retrograde als auch der anterograde Transport entlang der Mikrotubuli in neuronalen Zellen wird durch Motorproteine der Dynein- bzw. der Kinesin-Familie gewährleistet. Es konnte bereits beobachtet werden, dass DISC1 an „dynein intermediate chain“ (Dyn IC) und Kinesin-1 bindet und so den axonalen Transport von Ndel1/Lis1, Grb2 (growth factor bound protein 2) und Girdin beeinflusst (Wang and Brandon, 2011). Interessanterweise ist der Ndel1/Lis1-Komplex in Neuronen für den Transport schwerer Ladung, wie z.B. des Zellkerns, verantwortlich (McKenney et al., 2010), was für Migrationsprozesse von großer Bedeutung ist.

Die Stärke der Interaktion von DISC1 mit seinem Bindungspartner Ndel1 unterliegt der Kontrolle eines Proteinkomplexes, welcher somit einen Regulator von DISC1 repräsentiert. So phosphoryliert Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) das Protein „DIX domain containing 1 protein“ (Dixdc1) und verstärkt damit die Bindung zwischen DISC1 und Ndel1, was einen kritischen Prozess während der neuronalen Migration darstellt. (Camargo et al., 2007; Singh et al., 2010)

### 5.3 DISC1 interagiert mit Aktinkomponenten während der Migration kortikaler Interneurone

Die subzelluläre Verteilung von DISC1 in Interneuronen, als korbähnliche Struktur hinter dem Kern sowie in den Spitzen der Fortsätze, legt eine Interaktion mit Komponenten des Aktin-Zytoskeletts nahe (vgl. Abb. 7C). So könnte DISC1 beispielsweise über das Protein CAMDI auf MyosinII Einfluss nehmen, was als Motorprotein in Verbindung mit filamentösem Aktin eine Schubkraft in Interneuronen ausübt, die für die Kerntranslokation verantwortlich ist (Schaar and McConnell, 2005; Martini and Valdeolillos, 2010). Dieser calciumabhängige Prozess versetzt Interneurone in die Lage Kerntranslokationen unabhängig von Mikrotubuli zu realisieren, da ihnen dies nach Zugabe von Nocodazol – einem Pharmakon, welches das strukturierte Mikrotubulinetzwerk zerstört – weiterhin möglich ist. Im Gegensatz dazu kann durch Blebbistatin – einem Inhibitor für nichtmuskuläres MyosinII – die Migration der Interneurone geblockt werden. (Bellion et al., 2005) Diese Arbeiten zeigen, dass Schubkräfte entscheidend für die Migration kortikaler Interneurone sind und diese ausreichen um den Kern nach vorn zu bewegen (Abb. 19 linker Teil).

In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass DISC1 Einfluss auf Mediatoren der Aktin-Reorganisation nimmt. So ist die Entwicklung von postsynaptischen Kompartimenten exzitatorischer Synapsen – den sog. „spines“ – ebenfalls von einer korrekten DISC1-Expression abhängig. Bei diesem Entwicklungsprozess übt DISC1 eine Funktion auf das Aktin-Zytoskelett über zwischengeschaltete Faktoren wie Kalirin-7 – einem Faktor, der die Morphologie von „spines“ beeinflusst – oder TNIK (Traf2 and Nck-interacting kinase) aus (Wang and Brandon, 2011). TNIK reguliert die Aktin-Depolymerisation und es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit DISC1 die synaptische Struktur und Stabilität beeinflusst (Hussain et al., 2010).

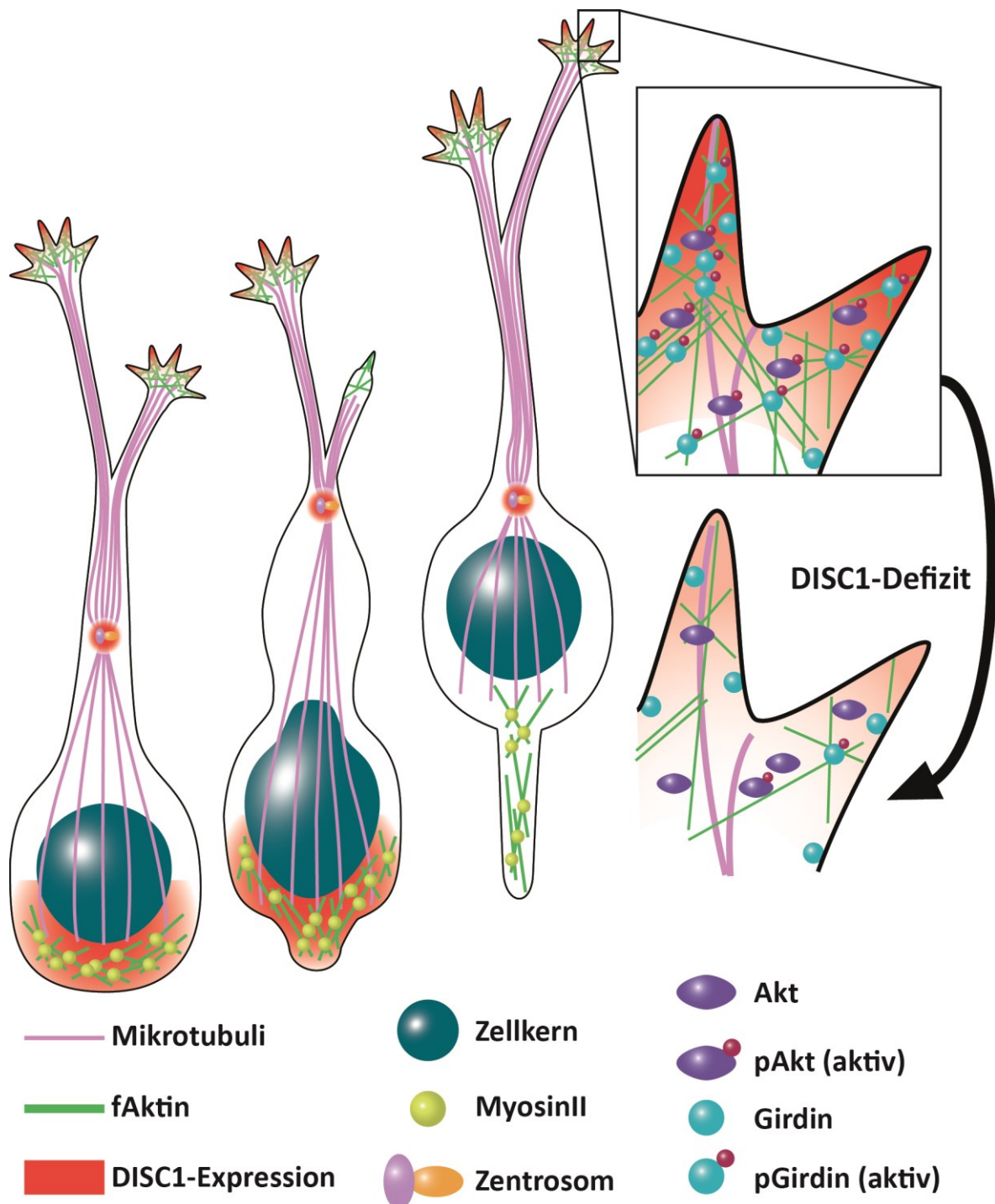
Die Resultate dieser Dissertation legen eine Funktion von DISC1 mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nahe, da in DISC1-miRNA-transfizierten Interneuronen eine Verringerung des filamentösen Aktins nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 11). Die Reorganisation von Aktin spielt bei Migrationsprozessen neuronaler Zellen eine entscheidende Rolle. So berichteten He et al. 2010, dass es einen nach vorn gerichteten Aktinfluss in cerebellaren Neuronen gibt, der essentiell für die Migration dieser Nervenzellen ist. Durch lokales Applizieren von Latrunculin (einer Substanz, die das Aktin-Zytoskelett depolymerisiert) am Führungsfortsatz konnte die Migration dieser Zellen unterbrochen



werden, wohingegen die lokale Applikation der Aktin-stabilisierenden Substanz Jasplakinolide am Fortsatz keinen Effekt auf die Migration dieser Zellen hatte (He et al., 2010). Ein überraschender Befund dieser Studie war, dass die Mikrotubuli-depolymerisierende Substanz Nocodazol die somale Translokation dieser Zellen sogar beschleunigte. Das könnte bedeuten, dass die Mikrotubuli eher eine zweitrangige Rolle während der somalen Translokation spielen, woraus die Autoren schlossen, dass diese eher für die Ausbildung des Fortsatzes verantwortlich sind.

Die tangentielle Migration kortikaler Interneurone ist ebenfalls entscheidend von einer korrekten Aktin-Reorganisation abhängig. Dies wird durch eine Studie belegt, in der ein Aktin-Nukleisationsfaktor (mDia) in Interneuronen ausgeschaltet wurde und die Interneurone intrinsische Migrationsdefekte aufwiesen (Shinohara et al., 2012). Die Interneurone von mDia-KO-Mäusen wiesen eine verringerte Formierung der korbähnlichen Aktinkondensation hinter dem Kern auf, wo mDia – ähnlich wie DISC1 – normalerweise exprimiert ist. Diese Zellen waren zwar in der Lage eine Schwellung vor dem Soma zu bilden, diese war aber, zusammen mit dem Zentrosom, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen näher am Kern lokalisiert. Dies legt einen zusätzlichen Einfluss von mDia auch auf die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts nahe. Interessanterweise war die radiale Migration kortikaler Pyramidenzellen in mDia-KO-Mäusen nicht beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls beobachtet werden, dass DISC1-miRNA-transfizierte Zellen eine Schwellung formieren können, in die der Zellkern aber nicht bewegt wird (vgl. Abb. 13).

Die Lage des Zentrosoms sowie die Aktinpolymerisation hinter dem Zellkern in Interneuronen mit verringerter DISC1-Expression könnte Gegenstand weiterführender Studien sein. Ein Resultat der vorliegenden Arbeit ist die Verringerung filamentösen Aktins in den Spitzen der Fortsätze, was für die Translokation dieser Interneurone ebenfalls entscheidend sein könnte, wie He et al. 2010 für cerebellare Neurone berichteten. Um diese Hypothese zu prüfen müsste eine lokale Applikation von Latrunculin am Fortsatz der Interneurone auf einem „feeder layer“ durchgeführt und die somale Translokation beobachtet werden. Diese Depolymerisation von Aktin würde den Phänotyp des DISC1-Defizits nachahmen und könnte so ähnliche Folgen nach sich ziehen, wie z.B. einen Migrationsdefekt und morphologische Veränderungen dieser Zellen.



**Abb. 19 Modell der saltatorischen Migration der Interneurone und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts im Fortsatz durch DISC1-Interaktionspartner**

Die saltatorische Bewegung kortikaler Interneurone folgt einem Muster, wobei der bifurkale Fortsatz zunächst die Umgebung auf Lenkungsfaktoren abtastet und wächst. Das Zentrosom wandert nach vorn und wird an der Membran verankert, wo ein primäres Zilium sowie eine Schwellung entstehen. Nun wird der Kern sprunghaft in die Schwellung bewegt, indem Aktin-Myosin-Komponenten am hinteren Ende eine Schubkraft ausüben und Mikrotubuliekomponenten vorn eine Zugkraft aufbringen. Am hinteren Ende entsteht ein hängender Fortsatz, welcher nachgezogen oder eingezogen wird. DISC1 ist in Interneuronen am hinteren Ende als korbartige Struktur und in den Spitzen der Fortsätze exprimiert. Eine korrekte Aktin-Reorganisation ist entscheidend für eine fehlerfreie Migration dieser Zellen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eine verringerte Aktivität von Girdin und Akt sowie eine Reduktion filamentösen Aktins in den Fortsätzen von DISC1-defizienten Interneuronen. Zusammen mit Studien von Enomoto et al. 2009 und Anai et al. 2005 führt dies zu einem Regulationsmodell, wobei DISC1 die Lokalisierung von Girdin im Fortsatz der Zellen sicherstellt und Girdin die Aktivität von Akt beeinflusst. Phosphoryliertes Akt wiederum aktiviert Girdin, was von der Membran ins Zytoplasma dissoziiert und dort Aktinfilamente vernetzt. Somit besteht zwischen Akt und Girdin eine positive Rückkopplung. Mit diesem Modell könnten morphologische sowie migratorische Defizite dieser Zellen nach einem DISC1-Mangel begründet werden.

Da eine DISC1-Herunterregulierung zu einer verringerten Phalloidininfärbung im Fortsatz führte, könnte dieser Effekt durch die Aktin-stabilisierende Substanz Jasplakinolide aufgehoben werden und möglicherweise eine korrekte somale Translokation der Interneurone wiederhergestellt werden.

Bislang wurde DISC1 nicht als direkter Bindungspartner von Aktin beschrieben. Daher ist es wahrscheinlich, dass DISC1 über zwischengeschaltete Faktoren Einfluss auf das Aktinzytoskelett nimmt. Das Protein Girdin („girders of actin filaments“) wurde als Aktin-Reorganisationsfaktor sowie als Interaktionspartner von DISC1 beschrieben, welcher Aktinfilamente miteinander verknüpft und für Migrationsprozesse von neuronalen Zellen notwendig ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Herunterregulieren von Girdin zu einer Zerstörung von Aktinbündeln führt. Die Lokalisation von aktiviertem Girdin in neuronalen Zellen weist eine Expression im Zellsoma um den Kern sowie den Wachstumskegeln der Axone hippocampaler Neurone als auch den Fortsätzen migrierender Zellen auf und ist im inaktivierten Zustand an die Zellmembran gebunden. Girdin wird durch das Protein Akt an Serin 1416 phosphoryliert, was zu einer Aktivierung dieses Proteins führt. Dadurch kommt es zur somalen Lokalisation von Girdin, was daraufhin filamentöses Aktin vernetzen kann. Eine Überexpression von Girdin wiederum führt zu einer Phosphorylierung von Akt an Thr 308 und Ser 473, welches dadurch aktiviert wird, wodurch eine positive Rückkopplung dieser beiden Faktoren zu Stande kommt. (Anai et al., 2005; Enomoto et al., 2009)

Diese Arbeiten zeigen, dass Girdin in der Signalkette unterhalb von Akt steht, was durch den Fakt erhärtet wird, dass in Girdin-KO-Mäusen die axonalen Defizite durch Expression einer permanent aktiven Form von Akt nicht rückgängig gemacht werden konnten (Enomoto et al., 2009). Dem gegenüber berichteten Kim et al. 2009, dass Girdin in Verbindung mit DISC1 die Akt-Aktivität an der Phosphorylierungsstelle Ser 473 verringert, was dafür spricht, dass Girdin in der Signalkette Akt übergeordnet ist. Des Weiteren wurde in dieser Publikation beschrieben, dass der Phänotyp einer Überexpression von Girdin mit der Expression einer permanent aktiven Form von Akt und einer Herunterregulation von DISC1 identisch ist. (Kim et al., 2009) In der vorliegenden Arbeit wurde ein verringertes pGirdin (phosphoryliertes/aktiviertes Girdin) -Signal in den äußers-ten Fortsätzen der Interneurone nach dem Herunterregulieren von DISC1 beobachtet. Dies ist möglicherweise die Ursache für ein destabilisiertes Aktinnetzwerk und damit für das verringerte Phalloidinsignal in den Spitzen der Fortsätze. Des Weiteren wurde eine Verringerung der phosphorylierten Form von Akt in diesen Zellen nachgewiesen, was

mit dem Modell von Kim et al. 2009 nicht vereinbar ist, welches im Falle einer verringerten DISC1-Expression eine erhöhte Aktivität von Akt prognostiziert (vgl. Abb. 12). Die vorliegende Datenlage deutet eher darauf hin, dass DISC1 in seiner Funktion als Kuppelungsprotein, welches die subzelluläre Verteilung von Proteinen sicherstellt, auch für die Lokalisation von Girdin in den Fortsätzen der Interneurone verantwortlich ist, wie bereits von Enomoto et al. 2009 für hippocampale Neurone beschrieben. Somit sind die Befunde einer gestörten Aktin-Reorganisation in den Fortsätzen der Interneurone wahrscheinlich das Resultat einer gestörten Verteilung von Girdin und weniger die Folge einer transkriptionellen Regulation der Expression von Girdin durch DISC1, da DISC1 bisher nicht als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde.

Das exakte Regelwerk der Faktoren Girdin, Akt und DISC1 untereinander muss auf molekularbiologischer Ebene aufgeklärt werden, wobei letztlich die hierarchische Organisation zwischen Akt, Girdin und DISC1 beschrieben werden könnte. Allerdings geben die Resultate der vorliegenden Arbeit Hinweise darauf, dass DISC1 über die zwischengeschalteten Faktoren Akt und Girdin Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett nimmt, indem DISC1 möglicherweise die Lokalisation von Girdin im Fortsatz der Interneurone sicherstellt. Anai et al. 2005 konnten zeigen, dass Girdin Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Dies könnte auch bei den vorliegenden Resultaten der Fall sein, da im Umkehrschluss ein verringertes pGirdin- als auch ein verringertes pAkt-Level in Interneuronen beobachtet wurde. (Abb. 19)

Eine korrekte Aktin-Reorganisation in neuronalen Zellen beeinflusst sowohl die Morphologie als auch die Migration neuronaler Zellen im sich entwickelnden Gehirn (Enomoto et al., 2009; He et al., 2010). Nach der Herunterregulierung von DISC1 in Interneuronen, und der damit einhergehenden Verringerung filamentösen Aktins, wurden morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet, welche zum Teil auch nach der Herunterregulation von Girdin beobachtet wurden. Dies legt eine Funktion dieser Faktoren auf das Aktin-Zytoskelett und somit der Morphologie dieser Zellen nahe. (Enomoto et al., 2009; Steinecke et al., 2012) Ein Girdin-Defekt in hippocampalen Neuronen hatte zusätzlich einen Migrationsdefekt dieser Zellen zur Folge, welche auf Grund dessen eine erhöhte Migration aufwiesen. In Interneuronen mit DISC1-Defizit, und damit eines verringerten pGirdin-Levels, konnte zwar ebenfalls ein Migrationsdefekt nachgewiesen werden, der allerdings eine verringerte Migration dieser Zellen nach sich zog. Somit führt ein DISC1-Defizit in migrierenden Interneuronen zu einer Verringerung der Migra-

tion per se, während ein solcher DISC1-Mangel in hippocampalen Neuronen zu einer Fehlpositionierung dieser Zellen führt (Enomoto et al., 2009).

Inwiefern Girdin selbst als Risikogen für Schizophrenie gilt, muss im Tiermodell, einer genetischen Analyse von Patienten mit Schizophrenie oder mit histologischen Untersuchungen an deren postmortalen Gehirnen getestet werden. Anders wurde das Protein Akt ähnlich wie DISC1 bereits als Risikogen für Schizophrenie beschrieben. So fand man in postmortalen Gehirnen von Schizophreniepatienten eine verringerte Aktivität von Akt1 sowie eine verringerte Akt-abhängige Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ . Konsistent dazu zeigen Akt-KO-Mäuse Verhaltensauffälligkeiten, die mit schizophrenen Symptomen korrelieren. (Arguello and Gogos, 2008)

## **5.4 Die Überexpression von DISC1 führt zur Bildung von Aggresomen**

Die dargelegten Beispiele verdeutlichen, dass die korrekte Balance und Koordination von Mediatoren des Zytoskeletts entscheidend für eine korrekte Migration von Interneuronen sind. So führt eine verringerte DISC1-Expression in diesen Zellen zu Migrationsdefiziten und es sollte ebenfalls überprüft werden, inwiefern eine Überexpression dieses Proteins einen Effekt auf deren Migration hat. Die Transfektion der Interneurone auf dem „feeder layer“ mit einem Konstrukt, welches für ein DISC1-GFP-Fusionsprotein kodiert, führte zu einer Akkumulation dieser Proteine in den Zellen, die in Folge dessen entweder starben oder keinerlei Migrationsverhalten aufwiesen.

Die Bildung solcher Aggresomen wurde bereits beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nach einer Überexpression von DISC1 ähnlich wie Prionen aus  $\alpha$ -synucleinen, Tau oder A $\beta$  bei Alzheimererkrankungen zwischen Neuronen nachweisbar sowie von Zelle zu Zelle übertragbar, d.h. zellinvasiv sind (Ottis et al., 2011; Korth, 2012). Es ist noch zu klären, inwieweit dies eine pathologische Ursache für Neurodegenerationen darstellt. Eine andere Studie konnte längst eine Verbindung zwischen DISC1 und Alzheimer nachweisen, da das APP („amyloid precursor protein“) mit DISC1 während der Entwicklung des Gehirns interagiert. APP wird proteolytisch durch das Enzym  $\gamma$ -Sekretase geschnitten und erzeugt bei fehlerhafter Prozessierung amyloid- $\beta$ -Proteine (A $\beta$ ), die als „plaques“ in den Gehirnen von Alzheimerpatienten zu finden sind (De Strooper and Annaert, 2000). Young-Pearse et al. 2010 konnten mit Hilfe der RNA-Interferenz gegen APP-mRNA zeigen, dass die radiale Migration kortikaler Projektions-

neurone gestört ist und dieser Effekt durch eine Koelektroporation mit DISC1-Expressionskonstrukten wieder rückgängig gemacht werden kann. Die Funktionen dieser Risikogene für Alzheimer und Schizophrenie während der Entwicklung des Gehirns deuten darauf hin, dass es sich sowohl bei Schizophrenie als auch bei Alzheimer um entwicklungsbiologische Erkrankungen handelt, die erst sehr spät im Leben der Patienten ausbrechen. (Jaaro-Peled et al., 2009; Young-Pearse et al., 2010)

## **5.5 Mäuse mit Mutationen im DISC1-Gen zeigen schizophre-nierelevante Verhaltensauffälligkeiten**

DISC1 wurde vor über zehn Jahren als Risikogen für Schizophrenie in einer schottischen Familie beschrieben, deren Mitglieder einen Defekt in diesem Gen tragen und vermehrt Erkrankungen des Schizophreniespektrums aufweisen (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001). Seit seiner Entdeckung wurden zahlreiche Funktionen von DISC1 beschrieben und es bestehen die Fragen, welche dieser Funktionen für welche Symptome der Schizophrenie verantwortlich sein könnten und welche der beschriebenen Veränderungen bei einer vererbten Mutation dieses Gens zu einer Pathologie führen. Da eine KO-Maus für DISC1 derzeit nicht verfügbar ist, können diese Fragen bislang nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Allerdings ist es bereits gelungen Mäuse mit Punktmutationen oder permanenter Expression dominant negativer Formen von DISC1 zu generieren. Bei diesen Stämmen wurden sowohl histologische Veränderungen als auch Verhaltensauffälligkeiten beobachtet, die mit denen in Schizophreniepatienten vergleichbar sind (Hikida et al., 2007; Shen et al., 2008; Lee et al., 2011).

So konnte gezeigt werden, dass Schizophreniepatienten Defizite bei der sog. „prepulse inhibition“ (Präpulsinhibition, PPI) aufweisen. Bei diesen Versuchen wird vor einem Schreckreiz (beispielsweise ein lauter Ton von ca. 115 dB) ein sog. „pre-pulse“ (Präpuls) verabreicht, welcher einen schwächeren Reiz desselben Sinneskanals darstellt (z.B. ein leiserer Ton von 16 dB über der Rauschschwelle), woraufhin die Schreckreaktion vermindert ist. Dies kann beim Menschen mit Hilfe der Lidschlagrate des Auges gemessen werden, welche sich nach einem Schreckreiz stark verringert. Wird nun vor dem Schreckreiz ein Präpuls gegeben, so ist die Lidschlagrate weniger stark verringert als ohne diesen. (Braff et al., 1978) Es findet somit eine Art „priming“ (Vorbereitung) statt, was in Folge des Präpulses auf mögliche Folge Reize hinweist. Dies geschieht durch inhibitorische neuronale Schaltkreise des limbischen Systems zwischen Frontalhirn, Stria-

tum und Thalamus oder Pons. Diese GABAergen Verbindungen verändern sich im Laufe der Entwicklung, woraufhin die PPI verstärkt wird. In Schizophreniepatienten konnte eine Verringerung der PPI beobachtet werden, wobei auditorische, taktile oder elektrische Reize Verwendung fanden. (Braff et al., 2001) Die Tatsache, dass die Entstehung GABAerger Verbindungen entscheidend für die Ausbildung dieser Reflexe ist, legt eine entwicklungsbiologische Rolle dieser Zellen bei der Pathophysiologie von Schizophrenie nahe.

Eine defizitäre PPI kann im Tiermodell untersucht werden und so konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die dominant negative Formen von DISC1 exprimieren, motiler während des Schreckreizes der „prepulse inhibition“ sind als Vergleichstiere, die auf diesen Reiz mit verminderter Aktivität, der sog. „startle response“ (Schreckstarre) reagieren. Diese Tiere antworten somit, ähnlich wie Schizophreniepatienten, mit einer verringerten physiologischen Reaktion auf den Schreckreiz. (Clapcote et al., 2007; Shen et al., 2008)

Eine andere Verhaltensauffälligkeit schizophrener Patienten ist depressives Verhalten, wie die Beobachtung der schottischen Familie ergab (Blackwood et al., 2001; Rascole et al., 2001). Solche komplexen Verhaltensweisen können bei Mäusen mit spezifischen Experimenten, wie z.B. „tail-suspension-tests“ oder „forced-swim-tests“ analysiert werden. Dabei werden die Tiere zum einen am Schwanz aufgehängt und zum anderen in einem Behälter mit Wasser gezwungen zu schwimmen und dabei gemessen, wie lange die Mäuse versuchen ihrer Situation zu entkommen. So stellen Mäuse mit einer DISC1-Mutation früher als Kontrolltiere ihre Bewegungen bei „tail-suspension-tests“ oder „forced-swim-tests“ ein, was mit depressivem Verhalten beim Menschen in Verbindung gebracht wird. (Shen et al., 2008) Histologisch weisen diese Tiere ebenfalls Auffälligkeiten auf, welche in postmortalen Gehirnen von Schizophreniepatienten in ähnlicher Form zu beobachten sind. So sind die Ventrikel dieser Tiere vergrößert, das *Corpus callosum* ist verkleinert, die Neuriten kortikaler Neurone sind kürzer sowie weniger verzweigt und die Anzahl parvalbuminer Interneurone im Kortex und im Hippocampus ist im Vergleich zu Kontrolltieren verringert (Hikida et al., 2007; Shen et al., 2008).

Eine korrekte neuronale Synchronisation ist entscheidend für die Funktion des Kortex, welche unter anderem durch GABAerge Interneurone gewährleistet wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese neuronale Synchronisation bei Patienten mit Schizophrenie gestört ist (Uhlhaas and Singer, 2010). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Schizophreniepatienten eine geringere Anzahl parvalbuminer Nervenzellen im Kor-

tex aufweisen als Nichterkrankte, was ursächlich für die Synchronisationsdefizite dieser Individuen sein könnte (Lewis et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Migrationsdefekt dieser GABAergen Interneurone nach dem Herunterregulieren eines Risikogens für Schizophrenie - DISC1 - in diesen Zellen beobachtet werden, was dazu führen könnte, dass auf Grund dessen weniger Interneurone im Kortex ankommen und es deshalb zu fehlerhafter Synchronisation und Funktion des Kortex kommt. Da die Anzahl der Interneurone in Kortex und Hippocampus zusätzlich durch Proliferations- und Apoptoseprozesse reguliert wird, ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine verringerte Anzahl inhibitorischer Neurone in Kortex und Hippocampus auch durch andere Prozesse zu Stande kommt (Southwell et al., 2012).

## **5.6 Schizophrenie stellt eine multikausale psychiatrische Erkrankung dar**

Neben DISC1 wurden auch andere Gene beschrieben, die als Risikogene für Schizophrenie gelten, und es bestehen verschiedene Hypothesen, wie es zur Entstehung dieser Erkrankung kommt (Lewis and Levitt, 2002). Hier ist die Dopaminhypothese zu nennen, wonach bei Schizophreniepatienten eine erhöhte Dopaminrezeptorexpression im Gehirn nachzuweisen ist, woraufhin es zu einer exzessiven Dopamintransmission kommt, was sowohl für die Ausprägung von Positivsymptomen als auch von Negativsymptomen der Schizophrenie verantwortlich zu sein scheint. Mit Hilfe von Dopaminantagonisten werden die Symptome der Schizophrenie am häufigsten behandelt, wobei diese erhebliche Nebenwirkungen, wie Erhöhung des Prolaktinlevels oder Gewichtszunahme, aufweisen. (Lang et al., 2007)

Die Erhöhung der Dopaminrezeptorexpression im Gehirn könnte allerdings auch einen Sekundäreffekt einer veränderten Glutamattransmission darstellen. So führen Antagonisten des N-methyl-D-aspartat-Glutamatrezeptors (NMDA-Rezeptor), wie z.B. Ketamin oder Phencyclidin, zu einer verstärkten Dopaminausschüttung und rufen in gesunden Probanden Psychosen hervor, wie sie Schizophreniepatienten häufig aufweisen (Krystal et al., 1994). Zusätzlich wurden in verschiedenen Familien mit erhöhter Prädisposition für Schizophrenie genetische Variationen der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors gefunden, was die Glutamathypothese zur Entstehung von Schizophrenie untermauert (Zhao et al., 2006; Li and He, 2007). Die Präsenz des NMDA-Rezeptors an der Oberfläche der Synapsen wird durch die Aktivität von Neuregulin-1 bestimmt, eines Faktors, wel-



cher ebenfalls in Zusammenhang mit der Entstehung von Schizophrenie gebracht wird. Zusammen mit seinem Rezeptor ErbB4 sorgt aktives Neuregulin-1 dafür, dass NMDA-Rezeptoren internalisiert werden, und es konnte beobachtet werden, dass in einigen Familien mit erhöhter Schizophrenierate Mutationen im Neuregulin-1-Gen auftraten. (Hall et al., 2006; Walss-Bass et al., 2006)

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sowohl das glutamaterge erregende System als auch das GABAerge inhibitorische System in Schizophreniepatienten gestört sind. So konnte im Frontal- sowie im Temporallappen postmortaler Gehirne von Schizophrenikern eine verminderte Expression der GABA-synthetisierenden Enzyme GAD65 und GAD67 beobachtet werden. Des Weiteren wurden in Patienten mit Schizophrenie Nukleotidpolymorphismen in Genen für die GABA-Rezeptoruntereinheiten gefunden, was eine Rolle dieses Systems in der Ontogenese dieser Erkrankung suggeriert. Ein weiterer biochemischer Signalweg, der Phosphoinositol-3Kinase (PI3)-Weg, steht derzeit im Fokus der Schizophrenieforschung. In Genen einiger Faktoren dieser Kaskade, wie z.B. GSK3 $\beta$ , BDNF, NRG1, Reelin, Akt und DISC1, konnten Mutationen nachgewiesen werden, welche eine erhöhte Prädisposition für Schizophrenie nach sich zogen. (Lang et al., 2007)

Die genannten Genfamilien beeinflussen und regulieren sich oft gegenseitig, wobei Querverbindungen entstehen, so dass ein komplexes Netzwerk zu Stande kommt, welches viele zelluläre Prozesse in nicht-hierarchischer Art und Weise steuert (Korth, 2012). DISC1 selbst wird beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor FOXP2 negativ reguliert und kann mit dem Transkriptionsfaktor DBZ („DISC1-binding-zinc-finger-protein“) interagieren und so die Expression vieler nachgeschalteter Gene regulieren (Hattori et al., 2007; Walker et al., 2012).

Zusätzlich zur genetischen Prädisposition können allerdings auch epigenetische Regulationsmechanismen zum Ausbruch der Erkrankung beitragen, wie z.B. pränatale Infektionen (Muller and Schwarz, 2006). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Produktion verschiedener Faktoren des Immunsystems, beispielsweise der Interleukine und der Interferone, in Schizophreniepatienten verändert ist. Zusätzlich konnten auf genetischer Ebene Polymorphismen innerhalb verschiedener Gene des Immunsystems beobachtet werden, die in Zusammenhang mit einer erhöhten Prävalenz für Schizophrenie gebracht werden. (Lang et al., 2007)

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sowie viele Publikationen legen nahe, dass Schizophrenie höchstwahrscheinlich eine multikausale entwicklungsbiologische

Erkrankung darstellt, deren Beschreibung auf Grund vieler verschiedener Faktoren, welche zur Entstehung dieser Krankheit beitragen, sehr komplex ist (Lewis and Levitt, 2002). Allerdings trägt die Untersuchung der Funktion einzelner Risikogene, wie z.B. DISC1, essentiell zum Verständnis dieser psychiatrischen Erkrankung bei.

Abschließend sei eine Metapher für den Zusammenhang zwischen DISC1 und Schizophrenie angefügt, welche David Porteous und Kirsty Millar – die Entdecker von DISC1 – 2009 in einer Veröffentlichung sehr treffend formulierten: „Extending the musical analogy to schizophrenia, if the conductor is off tempo, no matter how able the symphony of brain players, the net result will be off key. And even if the DISC1 conductor is on tempo, if any of the key players are out of tune, then the brain performance may be perceived as similarly discordant.” [zu Deutsch: “Vergleicht man klassische Musik mit Schizophrenie, so kann man sagen, dass wenn der Dirigent nicht im Takt ist, egal wie gut das Orchester der Mitspieler im Gehirn ist, das Resultat wird nicht im Takt sein. Und auch wenn der DISC1-Dirigent im Takt ist, wenn einer der Hauptmusiker sein Instrument falsch gestimmt hat, wird die Darbietung als ähnlich dissonant wahrgenommen.”] (Porteous and Millar, 2009).

## 6 Zusammenfassung

Das Gen „Disrupted-in-Schizophrenia-1“ (DISC1) gelangte zu Beginn dieses Jahrhunderts in den Fokus der Forschung von Psychiatern und Neurobiologen. Bei Mitgliedern einer schottischen Familie wurde ein Abbruch dieses Gens beobachtet, woraufhin diese eine erhöhte Wahrscheinlichkeit aufwiesen Erkrankungen des Schizophreniespektrums auszubilden. (Chubb et al., 2008) Das DISC1-Gen kodiert ein Protein, welches in neuronalen Zellen vielfältige Funktionen, wie Zellproliferation, Zellmigration und Zellpositionierung oder das Ausbilden von Synapsen, beeinflusst. In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle von DISC1 bei der Migration kortikaler Neurone, speziell kortikaler Interneurone, untersucht. Diese Zellen stellen mit 20% der kortikalen Nervenzellen eine Minderheit dar, sind allerdings funktionell sowie morphologisch hoch divers und für die korrekte Balance von Erregung und Hemmung in der Großhirnrinde entscheidend. So konnte beobachtet werden, dass bei Erkrankungen, wie Epilepsie, Autismus oder Schizophrenie, ein Defizit an kortikalen Interneuronen zu beobachten ist. (Le Magueresse and Monyer, 2013)

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass DISC1 für die tangentielle Migration kortikaler Interneurone in der Maus notwendig ist. DISC1 ist am Embryonaltag E14,5 in Vorläuferzellen kortikaler parvalbuminerger Neurone in der MGE exprimiert. Mit Hilfe der RNA-Interferenz war es möglich die Genexpression von DISC1 in diesen Zellen gezielt herunter zu regulieren, woraufhin die Interneurone ein vermindertes Migrationsverhalten aufwiesen. Die dynamische Beobachtung dieser DISC1-defizienten Zellen zeigte, dass der komplexe Prozess der saltatorischen Bewegung der Interneurone gestört war. Dieser Prozess wird durch Zytoskelettkomponenten realisiert und es wurde beobachtet, dass die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in DISC1-defizienten Interneuronen fehlerhaft war. Zusätzlich zum Migrationsdefekt DISC1-defizienter Zellen *in vitro* konnte dieser Effekt auch im lebenden Embryo reproduziert werden, wobei eine verminderte Anzahl DISC1-defizienter Interneurone den Kortex erreichten als unter Kontrollbedingungen.

Diese Befunde verbinden klinische Studien, welche Veränderungen kortikaler Interneurone in Patienten mit Schizophrenie beschrieben, mit der Annahme, dass es sich bei Schizophrenie um eine entwicklungsbiologische Erkrankung handelt (Lewis and Levitt, 2002).

## 7 Summary

The gene “Disrupted-in-Schizophrenia-1” (DISC1) got into the scientific focus of Psychiatrists and Neurobiologists at the beginning of the century. A disruption of this gene was discovered within members of a Scottish family, who have a higher predisposition to develop schizophrenia spectrum disorders (Chubb et al., 2008). The DISC1 gene encodes a protein, which showed multiple functions in neuronal cells, e.g. during proliferation, migration and positioning of neurons or the development of synapses. In this doctoral thesis the role of DISC1 during neuronal migration, especially interneuron migration was examined. These cells make up around 20% of all cortical neurons, thus representing a minority of neurons in the cortex. However, they are highly diverse in morphological as well as functional aspects and are necessary for the correct balance between excitation and inhibition in the brain. Thus it has been described, that patients with epilepsy, autism or schizophrenia display deficits in cortical interneurons. (Le Magueresse and Monyer, 2013)

In the present study it has been shown, that DISC1 is necessary for the correct tangential migration of interneurons in mice. The gene is expressed at embryonic stage E14.5 in precursor cells of parvalbuminergic interneurons deriving from the MGE. Using RNA interference techniques it was possible to successfully down regulate the DISC1 expression in those neurons, thereafter they react with a reduced migratory behavior. The dynamic observation of DISC1-deficient interneurons showed that the complex process of the saltatory movement of these cells was disturbed. This process is realized by cytoskeletal components and it was found that the reorganization of the actin cytoskeleton in DISC1-deficient interneurons was incorrect. In addition to the migration defect examined *in vitro*, this scenario could be reproduced *in vivo* using *in utero* electroporation to transfect MGE-derived interneurons with DISC1 or control miRNA. These experiments showed that fewer cells reached the cortex if they were transfected with DISC1-miRNA compared to the transfection with control constructs.

These findings provide a possible link between clinical studies reporting alterations of cortical interneurons in schizophrenic patients and the current notion of schizophrenia as a neurodevelopmental disorder (Lewis and Levitt, 2002).

## 8 Referenzen

- Akbadian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., Jones EG (1995) Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 52:258-266.
- Anai M, Shojima N, Katagiri H, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Fukushima Y, Horike N, Viana A, Kikuchi M, Noguchi N, Takahashi S, Takata K, Oka Y, Uchijima Y, Kurihara H, Asano T (2005) A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem* 280:18525-18535.
- Anderson SA, Volk DW, Lewis DA (1996) Increased density of microtubule associated protein 2-immunoreactive neurons in the prefrontal white matter of schizophrenic subjects. *Schizophr Res* 19:111-119.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.
- Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128:353-363.
- Arguello PA, Gogos JA (2008) A signaling pathway AKTing up in schizophrenia. *The Journal of clinical investigation* 118:2018-2021.
- Asada N, Sanada K (2010) LKB1-mediated spatial control of GSK3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli contributes to centrosomal forward movement and neuronal migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 30:8852-8865.
- Ascoli GA et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.
- Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128:29-43.
- Baudoin JP, Viou L, Launay PS, Luccardini C, Espeso Gil S, Kiyasova V, Irinopoulou T, Alvarez C, Rio JP, Boudier T, Lechaire JP, Kessaris N, Spassky N, Metin C (2012) Tangentially migrating neurons assemble a primary cilium that promotes their reorientation to the cortical plate. *Neuron* 76:1108-1122.
- Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25:5691-5699.

- Benes FM, Berretta S (2001) GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25:1-27.
- Blackwood DH, Visscher PM, Muir WJ (2001) Genetic studies of bipolar affective disorder in large families. *The British journal of psychiatry Supplement* 41:s134-136.
- Bolz J, Gilbert CD (1986) Generation of end-inhibition in the visual cortex via interlaminar connections. *Nature* 320:362-365.
- Bolz J, Gilbert CD (1989) The Role of Horizontal Connections in Generating Long Receptive Fields in the Cat Visual Cortex. *Eur J Neurosci* 1:263-268.
- Borrell V, Yoshimura Y, Callaway EM (2005) Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation. *J Neurosci Methods* 143:151-158.
- Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L (1978) Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15:339-343.
- Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49:171-178.
- Brandon NJ, Sawa A (2011) Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat Rev Neurosci* 12:707-722.
- Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A (2009) Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci* 29:12768-12775.
- Brodmann K (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig: Verlag von Johann Ambrosius Barth.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG, Fishell G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Butt SJ, Sousa VH, Fuccillo MV, Hjerling-Leffler J, Miyoshi G, Kimura S, Fishell G (2008) The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* 59:722-732.
- Camargo LM, Collura V, Rain JC, Mizuguchi K, Hermjakob H, Kerrien S, Bonnert TP, Whiting PJ, Brandon NJ (2007) Disrupted in schizophrenia 1 interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 12:74-86.

- Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK (2008) The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 13:36-64.
- Chung SH (1976) Brain of Reeler Mouse. *Nature* 260:14-15.
- Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC (2007) Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron* 54:387-402.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996a) Early olfactory fiber projections and cell migration into the rat telencephalon. *Int J Dev Neurosci* 14:853-866.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996b) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
- De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 ( Pt 11):1857-1870.
- Defelipe J et al. (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14:202-216.
- Du T, Xu Q, Ocbina PJ, Anderson SA (2008) NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating Lhx6. *Development* 135:1559-1567.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130:1146-1158.
- Eastwood SL, Harrison PJ (2003) Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Mol Psychiatry* 8:769, 821-731.
- Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M (2009) Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63:774-787.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marin O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.

- Garey LJ, Powell TP (1971) An experimental study of the termination of the lateral geniculocortical pathway in the cat and monkey. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 179:41-63.
- Gelman DM, Martini FJ, Nobrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marin O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29:9380-9389.
- Gilbert CD, Kelly JP (1975) The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol* 163:81-105.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120-125.
- Gleeson JG (2000) Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. *Curr Opin Neurol* 13:121-125.
- Goetz SC, Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* 11:331-344.
- Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puellas L, Rubenstein JL, Jones KR (2002) Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage. *J Neurosci* 22:6309-6314.
- Hall J, Whalley HC, Job DE, Baig BJ, McIntosh AM, Evans KL, Thomson PA, Porteous DJ, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC, Lawrie SM (2006) A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms. *Nat Neurosci* 9:1477-1478.
- Hatten ME (1990) Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 13:179-184.
- Hattori T, Baba K, Matsuzaki S, Honda A, Miyoshi K, Inoue K, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shimizu S, Yukioka F, Kumamoto N, Yamaguchi A, Tohyama M, Katayama T (2007) A novel DISC1-interacting partner DISC1-Binding Zinc-finger protein: implication in the modulation of DISC1-dependent neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* 12:398-407.
- He M, Zhang ZH, Guan CB, Xia D, Yuan XB (2010) Leading tip drives soma translocation via forward F-actin flow during neuronal migration. *J Neurosci* 30:10885-10898.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Higginbotham HR, Gleeson JG (2007) The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* 30:276-283.



- Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, Xue R, Andrade M, Tankou S, Mori S, Gallagher M, Ishizuka K, Pletnikov M, Kida S, Sawa A (2007) Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14501-14506.
- Hu H (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703-711.
- Huang J, Roberts AJ, Leschziner AE, Reck-Peterson SL (2012) Lis1 acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell* 150:975-986.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *JPhysiol* 160:106-154.
- Hussain NK, Hsin H, Haganir RL, Sheng M (2010) MINK and TNIK differentially act on Rap2-mediated signal transduction to regulate neuronal structure and AMPA receptor function. *J Neurosci* 30:14786-14794.
- Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC, Kanki H, Seshadri S, Robinson JF, Murdoch H, Dunlop AJ, Kubo K, Furukori K, Huang B, Zeledon M, Hayashi-Takagi A, Okano H, Nakajima K, Houslay MD, Katsanis N, Sawa A (2011) DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature* 473:92-96.
- Jaaro-Peled H, Hayashi-Takagi A, Seshadri S, Kamiya A, Brandon NJ, Sawa A (2009) Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends in Neurosciences* 32:485-495.
- Joshi D, Fung SJ, Rothwell A, Weickert CS (2012) Higher gamma-aminobutyric acid neuron density in the white matter of orbital frontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 72:725-733.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature Cell Biology* 7:1167-1178.
- Kandel ER (2012) Principles of neural science, 5th Edition. New York: McGraw-Hill.
- Kant I (1798) Anthropologie in pragmatischer Hinsicht. Königsberg,: F. Nicolovius.
- Katz LC, Callaway EM (1992) Development of Local Circuits in Mammalian Visual-Cortex. *Annual Review of Neuroscience* 15:31-56.
- Kilb W (2012) Development of the GABAergic system from birth to adolescence. *Neuroscientist* 18:613-630.

- Kim DH, Rossi JJ (2007) Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8:173-184.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL (2009) DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 63:761-773.
- Korth C (2012) Aggregated proteins in schizophrenia and other chronic mental diseases: DISC1opathies. *Prion* 6:134-141.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Lancaster MA, Schroth J, Gleeson JG (2011) Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nat Cell Biol* 13:700-707.
- Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seeböhm N, Gallinat J (2007) Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 20:687-702.
- Le Magueresse C, Monyer H (2013) GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* 77:388-405.
- Lee FH, Fadel MP, Preston-Maher K, Cordes SP, Clapcote SJ, Price DJ, Roder JC, Wong AH (2011) Disc1 point mutations in mice affect development of the cerebral cortex. *J Neurosci* 31:3197-3206.
- Lee JH, Gleeson JG (2010) The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol Dis* 38:167-172.
- Lehmann K, Steinecke A, Bolz J (2012) GABA through the ages: regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons. *Neural Plast* 2012:892784.
- Levitt P (2005a) Disruption of interneuron development. *Epilepsia* 46 Suppl 7:22-28.
- Levitt P (2005b) Developmental neurobiology and clinical disorders: lost in translation? *Neuron* 46:407-412.
- Lewis DA, Levitt P (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25:409-432.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW (2012) Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci* 35:57-67.

- Li C, Inglis PN, Leitch CC, Efimenko E, Zaghloul NA, Mok CA, Davis EE, Bialas NJ, Healey MP, Heon E, Zhen M, Swoboda P, Katsanis N, Leroux MR (2008) An essential role for DYF-11/MIP-T3 in assembling functional intraflagellar transport complexes. *PLoS Genet* 4:e1000044.
- Li D, He L (2007) Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: a HuGE review and meta-analysis. *Genet Med* 9:4-8.
- Li R, Gundersen GG (2008) Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:860-873.
- Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V (2007) Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 27:3078-3089.
- Lund RD, Mustari MJ (1977) Development of the geniculocortical pathway in rats. *J Comp Neurol* 173:289-306.
- Mao YW, Ge XC, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH (2009) Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 beta/beta-Catenin Signaling. *Cell* 136:1017-1031.
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780-790.
- Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Marin O, Yaron A, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JL (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293:872-875.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Martini FJ, Valdeolmillos M (2010) Actomyosin contraction at the cell rear drives nuclear translocation in migrating cortical interneurons. *J Neurosci* 30:8660-8670.
- Martini FJ, Valiente M, Lopez Bendito G, Szabo G, Moya F, Valdeolmillos M, Marin O (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136:41-50.
- McConnell SK (1988) Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res* 472:1-23.

- McKenney RJ, Vershinin M, Kunwar A, Vallee RB, Gross SP (2010) LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell* 141:304-314.
- McKinsey GL, Lindtner S, Trzcinski B, Visel A, Pennacchio LA, Huylebroeck D, Higashi Y, Rubenstein JL (2013) Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron* 77:83-98.
- McManus MF, Nasrallah IM, Pancoast MM, Wynshaw-Boris A, Golden JA (2004) Lis1 is necessary for normal non-radial migration of inhibitory interneurons. *Am J Pathol* 165:775-784.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23:894-900.
- Meyer-Lindenberg A (2010) From maps to mechanisms through neuroimaging of schizophrenia. *Nature* 468:194-202.
- Millar JK, Christie S, Semple CA, Porteous DJ (2000) Chromosomal location and genomic structure of the human translin-associated factor X gene (TRAX; TSNAX) revealed by intergenic splicing to DISC1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Genomics* 67:69-77.
- Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1:221-229.
- Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G (2007) Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27:7786-7798.
- Miyoshi K, Honda A, Baba K, Taniguchi M, Oono K, Fujita T, Kuroda S, Katayama T, Tohyama M (2003) Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* 8:685-694.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP (2003) DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12:1591-1608.
- Muller N, Schwarz M (2006) Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. *Neurotox Res* 10:131-148.
- Nadarajah B, Parnavelas JG (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.
- Namba T, Ming GL, Song H, Waga C, Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S (2011) NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *J Neurochem* 118:34-44.

- Narayan S, Nakajima K, Sawa A (2013) DISC1: A Key Lead in Studying Cortical Development and Associated Brain Disorders. *Neuroscientist*.
- Nobrega-Pereira S, Kessaris N, Du T, Kimura S, Anderson SA, Marin O (2008) Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59:733-745.
- Ottis P, Bader V, Trossbach SV, Kretschmar H, Michel M, Leliveld SR, Korth C (2011) Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggresomes. *Biol Psychiatry* 70:604-610.
- Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A (2002) Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129:3147-3160.
- Porteous D, Millar K (2009) How DISC1 regulates postnatal brain development: girdin gets in on the AKT. *Neuron* 63:711-713.
- Powell EM, Mars WM, Levitt P (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30:79-89.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141:283-312.
- Rakic P (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
- Rasclé C, Mazas O, Vaiva G, Tournant M, Raybois O, Goudemand M, Thomas P (2001) Clinical features of latent inhibition in schizophrenia. *Schizophr Res* 51:149-161.
- Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:981-989.
- Rudolph J, Zimmer G, Steinecke A, Barchmann S, Bolz J (2009) Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh Migr* 4:400-408.
- Rudolph J, Zimmer G, Gerstmann K, Steinecke A, Bolz J (2013) Differential effects of EphB1 on cortical and striatal neurons. in preparation.
- Sanacora G, Mason GF, Krystal JH (2000) Impairment of GABAergic transmission in depression: new insights from neuroimaging studies. *Crit Rev Neurobiol* 14:23-45.
- Schaar BT, McConnell SK (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13652-13657.

- Seshadri S, Kamiya A, Yokota Y, Prikulis I, Kano S, Hayashi-Takagi A, Stanco A, Eom TY, Rao S, Ishizuka K, Wong P, Korth C, Anton ES, Sawa A (2010) Disrupted-in-Schizophrenia-1 expression is regulated by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1-neuregulin cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5622-5627.
- Seuntjens E, Nityanandam A, Miquelajauregui A, Debruyne J, Stryjewska A, Goebbels S, Nave KA, Huylebroeck D, Tarabykin V (2009) Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* 12:1373-1380.
- Shen SB, Lang B, Nakamoto C, Zhang F, Pu J, Kuan SL, Chatzi C, He S, Mackie I, Brandon NJ, Marquis KL, Day M, Hurko O, McCaig CD, Riedel G, St Clair D (2008) Schizophrenia-Related Neural and Behavioral Phenotypes in Transgenic Mice Expressing Truncated Disc1. *Journal of Neuroscience* 28:10893-10904.
- Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S (2012) A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci* 15:373-380, S371-372.
- Singh KK, Ge X, Mao Y, Drane L, Meletis K, Samuels BA, Tsai LH (2010) Dixdc1 is a critical regulator of DISC1 and embryonic cortical development. *Neuron* 67:33-48.
- Southwell DG, Paredes MF, Galvao RP, Jones DL, Froemke RC, Sebe JY, Alfaro-Cervello C, Tang Y, Garcia-Verdugo JM, Rubenstein JL, Baraban SC, Alvarez-Buylla A (2012) Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491:109-113.
- Steinecke A, Gampe C, Valkova C, Kaether C, Bolz J (2012) Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. *J Neurosci* 32:738-745.
- Steinecke A, Zimmer G, Gampe C, Rudolph J, and Bolz J. (2013) EphA/ephrin-A Reverse Signaling Promotes the Migration of MGE-derived Cortical Interneurons. *Development*, under revision.
- Taniguchi Y, Young-Pearse T, Sawa A, Kamiya A (2012) In utero electroporation as a tool for genetic manipulation in vivo to study psychiatric disorders: from genes to circuits and behaviors. *Neuroscientist* 18:169-179.
- Taverna E, Huttner WB (2010) Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67:906-914.
- Tomassy GS, Lodato S, Arlotta P (2013) A sip of GABA for the cerebral cortex. *Neuron* 77:1-3.
- Tsai JW, Bremner KH, Vallee RB (2007) Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci* 10:970-979.

- Tsai LH, Gleeson JG (2005) Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46:383-388.
- Uhlhaas PJ, Singer W (2010) Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11:100-113.
- van den Berghe V et al. (2013) Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1. *Neuron* 77:70-82.
- Walker RM, Hill AE, Newman AC, Hamilton G, Torrance HS, Anderson SM, Ogawa F, Derizioti P, Nicod J, Vernes SC, Fisher SE, Thomson PA, Porteous DJ, Evans KL (2012) The DISC1 promoter: characterization and regulation by FOXP2. *Hum Mol Genet* 21:2862-2872.
- Walss-Bass C, Liu W, Lew DF, Villegas R, Montero P, Dassori A, Leach RJ, Almasry L, Escamilla M, Raventos H (2006) A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60:548-553.
- Wang Q, Brandon NJ (2011) Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Mol Cell Neurosci* 48:359-364.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Herrera DG, Alvarez-Buylla A (1999) Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2:461-466.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Wonders CP, Anderson SA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7:687-696.
- Yaworsky PJ, Kappen C (1999) Heterogeneity of neural progenitor cells revealed by enhancers in the nestin gene. *Dev Biol* 205:309-321.
- Young-Pearse TL, Suth S, Luth ES, Sawa A, Selkoe DJ (2010) Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J Neurosci* 30:10431-10440.
- Yozu M, Tabata H, Nakajima K (2005) The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J Neurosci* 25:7268-7277.
- Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L, Liu H, He L (2006) Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:747-753.

- Zimmer G, Garcez P, Rudolph J, Niehage R, Weth F, Lent R, Bolz J (2008) Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 28:62-73.
- Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, Bolz J (2011) Bidirectional EphrinB3/EphA4 Signaling Mediates the Segregation of Medial Ganglionic Eminence- and Preoptic Area-Derived Interneurons in the Deep and Superficial Migratory Stream. *J Neurosci* 31:18364-18380.



## **9 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe. Dabei wurden keinerlei Textabschnitte Dritter oder eigener Prüfungsarbeiten ohne deren Kennzeichnung übernommen und keinerlei Hilfsmittel oder persönliche Mitteilungen ohne Angabe deren Quellen benutzt. Die DNA-Konstrukte zur Transfektion neuronaler Zellen wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Christin Gampe hergestellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Des Weiteren erhielt ich von Christin Gampe hilfreiche Kommentare zur Erstellung des Manuskripts. Die Hilfe von Promotionsberatern oder Dritter, welche mittelbar oder unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhielten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, wurde nicht in Anspruch genommen. Die vorliegende Dissertation ist zuvor nicht bereits als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht worden. Ich versichere bisher keinerlei Dissertation an einer Hochschule eingereicht zu haben.

André Steinecke

## **10 Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

**Name** André Steinecke

**Geburtstag** 21/06/1983 - Gotha

### **Privatadresse**

Closewitzer Str. 2c, 07743 Jena, Deutschland

E-mail: [a.steinecke83@googlemail.com](mailto:a.steinecke83@googlemail.com)

Telefon: 0162/3360261

### **Berufliche Adresse**

Friedrich-Schiller-Universität Jena,

Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie

Erbertstrasse 1, 07743 Jena, Deutschland

Telefon: 03641/949129

E-mail: [a.steinecke@uni-jena.de](mailto:a.steinecke@uni-jena.de)

### **Schulische Ausbildung**

1990 – 2002 Abitur

Gustav-Freytag-Gymnasium

Gotha

### **Zivildienst**

2002 – 2003 Johanniter Unfallhilfe Gotha

### **Akademische Ausbildung**

2004 – Oktober 2009

Studium der Biologie, mit Abschluss Diplom (Note: 1,1)

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland

Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie

Titel der Diplomarbeit: Funktionelle Analyse des Ephrin/Eph-Systems bei der Tangentialen Migration kortikaler Interneurone

Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Bolz

Seit 2009

Doktorand

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany

Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie

Thema: Die Rolle des Gens Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC1) bei der Tangentialen Migration kortikaler Interneurone der Maus

Landesgraduiertenstipendium des Freistaates Thüringen seit April 2010

Stipendium zur Teilnahme an „Neurodevelopmental practical course“ OIST Japan

### **Begutachtete Publikationen**

Steinecke A, Zimmer G, Gampe C, Rudolph J, and Bolz J

EphA/ephrin-A Reverse Signaling Promotes the Migration of MGE-derived Cortical Interneurons

Development, under revision

Steinecke A, Gampe C, Valkova C, Kaether C, and Bolz J

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is Necessary for the Correct Migration of Cortical Interneurons

The Journal of Neuroscience, 2012, 32:738-745, inclusive Cover-Illustration

Lehmann K, Steinecke A, and Bolz J

GABA through the ages: Regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons

Neuronal Plasticity, 2012, 2012:892784

Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, and Bolz J

Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of MGE- and POA-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream

The Journal of Neuroscience, 2011, 31:18364-18380

Zimmer G, Menezes S, Bürger S, Weth F, Steinecke A, Bolz J, and Lent R

The role of Chondroitin sulfate/Sema3A interactions during tangential migration of cortical interneurons

Cerebral cortex, 2010, 10:2411-22

Rudolph J, Zimmer G, Steinecke A, Barchmann S, and Bolz J

Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon

Cell Adhesion and Migration, 2010, 4:400-408

### **Nicht begutachtete Publikationen**

Steinecke A, Gampe C, Nitzsche F, and Bolz J

Disrupting interneuron migration by Disrupted-in-Schizophrenia1 (DISC1)

Short talk, Neurex workshop: Cell migration in the brain, Strasbourg, 9.6-7.2012

Nitzsche F, Gampe C, Steinecke A, and Bolz J

DISC1 expression pattern in the developing mouse brain

Poster, 42<sup>nd</sup> annual meeting of the society for neuroscience, New Orleans 2012

Gampe C, Steinecke A, and Bolz J

Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons

Poster, 41<sup>st</sup> annual meeting of the society for neuroscience, Washington D.C. 2011

Steinecke A, Gampe C, Pensold D, and Bolz J

The role of Disc1 during interneuron migration

Poster, 9<sup>th</sup> annual meeting of the german neuroscience society, Goettingen 2011

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G, and Bolz J

Ephrin-B3 reverse signaling regulates the tangential migration of cortical interneurons in the basal telencephalon

Poster, 9<sup>th</sup> annual meeting of the german neuroscience society, Goettingen 2011

Steinecke A, Rudolph J, Zimmer G, Barchmann S, and Bolz J

A dual role of EphA4 signaling in the basal telencephalon during interneuron migration

Poster, 40<sup>th</sup> annual meeting of the society for neuroscience, San Diego 2010

DAAD travel grant for A.S.

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G, and Bolz J

Ephrin-B3 reverse signaling in the basal telencephalon during interneuron migration

Poster, 40<sup>th</sup> annual meeting of the society for neuroscience, San Diego 2010

Steinecke A, Rudolph J, Zimmer G, and Bolz J

EphA4-induced reverse signaling acts as a motogen for GABAergic interneurons

Poster, 39<sup>th</sup> annual meeting of the society for neuroscience, Chicago 2009

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G, and Bolz J

B-Ephrins regulate the tangential migration of cortical interneurons

Poster, 39<sup>th</sup> annual meeting of the society for neuroscience, Chicago 2009

## **11 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz, der das Interesse für Neurobiologie in mir weckte und der mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Dabei stand er mir stets als hilfreicher Diskussionspartner mit konstruktiver Kritik zur Verfügung und half mir beim Zusammenstellen dieser Arbeit. Des Weiteren gilt mein Dank seinem Einsatz für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit und vielen Kongressreisen sowie Praktika, welche hilfreich und wegweisend für dieses und weitere Projekte waren.

Bei Herrn Dr. Christoph Kaether und Herrn Dr. Dominique Bagnard möchte ich mich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bolz danken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders möchte ich hier Christin Gampe danken, deren praktische und geistreiche Hilfe mir beim Erstellen der Doktorarbeit zugutekam.

Unserer Sekretärin Frau Behr möchte ich für ihre Offenheit danken, die sie mir in allerlei Problemen und Anliegen entgegenbrachte sowie den technischen Mitarbeitern Frau Raue für ihre exzellente Laborarbeit und Michael Richter für seine Hilfe bei technischen Angelegenheiten.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit, den Glauben an mich, der mir immer wieder Motivation gab und mich in meinem Tun bestärkte, sowie für den Rückhalt und die Geborgenheit zu Hause.

All meinen Freunden in Jena und Gotha möchte ich für viele gemeinsame Stunden, schöne Freizeitaktivitäten und Reisen danken, in denen ich neue Kraft für meine Arbeit schöpfte.

## 12 Anhang

### 12.1 Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb	Abbildung
AEP	Area Entopedunculare
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrokarbonat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FBS	fötales Kälberserum
GBSS	Gey's balanced salt solution
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
kbp	Kilobasenpaare
LGE	laterale ganglionische Eminenz
M	Molar
min	Minuten
MGE	mediale ganglionische Eminenz
mRNA	Boten-RNA
MZ	Marginalzone
n	Stichprobenanzahl
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFA	Paraformaldehyd
POA	präoptisches Areal
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
sog.	sogenannt
SVZ	Subventrikularzone
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	Units
VZ	Ventrikularzone
z.B.	zum Beispiel



## **12.2 Ausgewählte Publikationen**

An dieser Stelle sind zwei ausgewählte Publikationen, welche im Laufe der vorliegenden Dissertation veröffentlicht wurden, angehängt.

1. Steinecke A, Gampe C, Valkova C, Kaether C, Bolz J (2012) Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. J Neurosci 32:738-745. Inklusive Cover Illustration.
2. Lehmann K, Steinecke A, Bolz J (2012) GABA through the ages: regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons. Neural Plast 2012:892784.

The Journal of Neuroscience

January 11, 2012

Volume 32 Number 2

pages 403-758

# *The Journal of Neuroscience*

January 11, 2012 • Volume 32 Number 2 • www.jneurosci.org

- All Axonal Neurofilaments Move
- ▲ TIMP-1 Contributes to Neuronal Death after Seizures
- Prefrontal Cortex Exerts Dual Effects on Nucleus Accumbens
- ◆ Metabotropic Glutamate Receptors Regulate Electrical Coupling

SfN  
SOCIETY FOR NEUROSCIENCE

# Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) Is Necessary for the Correct Migration of Cortical Interneurons

André Steinecke,<sup>1\*</sup> Christin Gampe,<sup>1\*</sup> Christina Valkova,<sup>2</sup> Christoph Kaether,<sup>2</sup> and Jürgen Bolz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Universität Jena, 07743 Jena, Germany, and <sup>2</sup>Leibniz Institut für Altersforschung-Fritz Lipmann Institut, 07745 Jena, Germany

*Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)* is a prominent susceptibility gene for major psychiatric disorders. Previous work indicated that DISC1 plays an important role during neuronal proliferation and differentiation in the cerebral cortex and that it affects the positioning of radial migrating pyramidal neurons. Here we show that in mice, DISC1 is necessary for the migration of the cortical interneurons generated in the medial ganglionic eminence (MGE). RT-PCR, *in situ* hybridizations, and immunocytochemical data revealed expression of DISC1 transcripts and protein in MGE-derived cells. To study the possible functional role of DISC1 during tangential migration, we performed *in utero* and *ex utero* electroporation to suppress DISC1 in the MGE *in vivo* and *in vitro*. Results indicate that after DISC1 knockdown, the proportion of tangentially migrating MGE neurons that reached their cortical target was strongly reduced. In addition, there were profound alterations in the morphology of DISC1-deficient neurons, which exhibited longer and less branched leading processes than control cells. These findings provide a possible link between clinical studies reporting alterations of cortical interneurons in schizophrenic patients and the current notion of schizophrenia as a neurodevelopmental disorder.

## Introduction

*Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)* is considered as one of the most compelling risk genes for schizophrenia, but also for other major psychiatric diseases. The biological functions attributed to the DISC1 protein are complex and highly diverse. For example, previous work suggested that DISC1 plays an important role during neuronal proliferation, differentiation, neurite outgrowth, synapse formation, as well as in the genesis and integration of new neurons in the adult hippocampus (for review, see Brandon et al., 2009). There are also several studies that report that DISC1 is a necessary component for the correct positioning of radially migrating cortical pyramidal neurons (Kamiya et al., 2005; Young-Pearse et al., 2010).

We were interested whether DISC1 plays a role in the migratory behavior of cortical interneurons. There are distinct differences in the mode of migration of pyramidal neurons and interneurons. In contrast to cortical projection neurons, interneurons are generated in the medial ganglionic eminence (MGE), the caudal eminence, and the preoptic area (POA) of the basal telencephalon and perform a glia-independent long-range migration in a saltatory fashion (Marín and Rubenstein, 2001). They first extend a highly dynamic branched leading process and

thereby scan for extracellular guidance cues that determine their migratory pathway (Valiente and Marín, 2010). Neurite elongation then stops and the nucleus moves forward, a process called nucleokinesis, and the migratory cycle starts again (Métin et al., 2006).

In this study, we first demonstrate that DISC1 transcripts and proteins are present in the MGE of embryonic day (E) 14.5 mouse embryos. We then manipulated DISC1 expression by RNA interference in individual MGE-derived interneurons to characterize cell-autonomous effects of DISC1. Results indicate that interneuron migration is severely delayed after DISC1 suppression. In addition to these migratory deficits, DISC1 knockdown also leads to distinct morphological changes of interneurons, suggesting a causal relationship between alterations in the cytoskeleton and the impaired migration behavior.

## Materials and Methods

**Mice.** Animals used were timed pregnant C57BL/6 mice. The day of insemination was considered as E1. Mice were killed using peritoneal injection of 10% chloral hydrate. All animal procedures were performed in agreement with the institutional regulations of the University of Jena.

**Plasmids.** For DISC1 knockdown, the BLOCK-iT Pol II miR RNAi expression vector kit (Invitrogen) was used to design miRNA-expressing vectors targeting the sequence AGGCAAACACTGTGAAGTGCA, as described previously (Kamiya et al., 2005). As a control vector, we used a scrambled miRNA sequence that is predicted not to target any known vertebrate sequence. For rescue experiments, the DISC1 miRNA vector (0.75  $\mu$ g/ $\mu$ l) was coelectroporated with either a pCMV6-XL5 encoding the human DISC1 transcript Lv (SC301729; OriGene Technologies) or a pCAX including mouse DISC1 (a gift from Dr. Sawa, Johns Hopkins University, Baltimore, MD), each at 2.25  $\mu$ g/ $\mu$ l. For overexpression of mouse DISC1 in NIH3T3, the DISC1 coding region from pCAX was cloned into pmRFP-C1.

**Antibodies.** The following primary antibodies were used:  $\alpha$ DISC1 (1:50 for staining and 1:200 for Western Blotting; SC-47990, Lot #2011;

Received Oct. 4, 2011; revised Nov. 24, 2011; accepted Dec. 1, 2011.

Author contributions: A.S., C.G., and J.B. designed research; A.S., C.G., C.V., and C.K. performed research; C.V. and C.K. contributed unpublished reagents/analytic tools; A.S. and C.G. analyzed data; J.B. wrote the paper.

We thank Dr. Morrison for providing the  $\alpha$ GAPDH antibody and Dr. Sawa for the murine DISC1 expression vector. We also thank Christine Raue for excellent technical assistance.

\*A.S. and C.G. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Jürgen Bolz, Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Universität Jena, Erbertstrasse 1, 07743 Jena, Germany. E-mail: jurgen.bolz@uni-jena.de.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5036-11.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/320738-08\$15.00/0

Santa Cruz Biotechnology),  $\alpha$ GAPDH (1:1000; a gift from Dr. Morrison, Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany),  $\alpha$ -Lim-homeobox-gene 6 ( $\alpha$ Lhx6; 1:200; SC-98607, Lot #B-1609; Santa Cruz Biotechnology),  $\alpha$ Calbindin (1:2000; Swant), and  $\alpha$ GFP (1:1000; Invitrogen). Nuclei were stained with 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI).

**RT-PCR.** Tissue from the MGE of E14.5 mice and tissue from the hippocampus of the mother were homogenized in trizol and RNA was isolated using chloroform and isopropyl alcohol. cDNA synthesis was performed using oligo dT primer. For RT-PCR, cDNA was amplified by the following primer pair: ACCCAGGATAGCCTGCCTGCA and ATCAGGTCACAGCCCGGCCA, using a HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen).

**In situ hybridization.** For *in situ* hybridization, a fragment of the mouse DISC1 (bases 1355–2031) was cloned into a pBluescript vector and DIG-labeled sense and antisense probes were generated. *In situ* hybridizations were performed as described previously (Zimmer et al., 2008).

**Primary cell culture.** For dissociated neurons from the MGE of E14.5 embryos, MGEs were dissected and collected in ice-cold HBSS supplemented with 0.65% glucose. After incubation with 0.025% trypsin in HBSS for 17 min at 37°C, tissue was dissociated into single cells by trituration and filtered through a nylon gauze to remove cell aggregates. Neurons were cultured in DMEM [supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 0.4 mM L-glutamine] at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 2 d.

To approve the antigen specificity, *ex utero* electroporation was performed and neurons were extracted from the MGE as described above.

**Fibroblast cell culture and Western blotting.** NIH3T3 cells were grown in DMEM-F12 with 10% FBS and 5% penicillin/streptomycin under standard cell culture conditions and transfected with plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cells were lysed after 32 h in STEN buffer (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 0.2% NP-40). Lysates were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in TBS-T buffer (300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.6, and 0.1% Tween 20) for 30 min and then incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature (RT) or overnight at 4°C. After washing in TBS-T (four times for 8 min), membranes were incubated for 1 h at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Membranes were washed again in TBS-T and the signal was detected using enhanced chemiluminescence.

**Immunocytochemistry.** Neurons and NIH3T3 were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), washed with PBS containing 0.2% Triton X-100, and blocked for 1 h with 5% bovine serum albumin (BSA), 0.3% Tween 20 in PBS containing 0.2% Triton X-100. For immunostainings against Lhx6, cells were washed in heated citrate buffer and a blocking solution containing sodium azide was used (1% milk, 10% FBS, 1 mg/ml BSA, and 52  $\mu$ g/ml sodium azide in PBS). Primary antibodies were applied overnight. After washing with PBS, secondary antibodies were incubated for 1 h followed by washes in PBS and DAPI staining.

**Immunohistochemistry.** For immunohistochemistry, freshly prepared cryosections (18  $\mu$ m) were fixed in 4% PFA in PBS for 30 min (for DISC1: 2% PFA, 10 min) and washed in 0.2% Triton X-100 in PBS, blocked in 10% goat serum, 5% BSA, and 0.2% Triton X-100 in PBS for 1 h, followed by the incubation of the primary antibodies overnight. For immunostainings against Lhx6, slices were cooked in citrate buffer and a special blocking solution containing sodium azide was used (1% milk, 10% FBS, 1 mg/ml BSA, and 52  $\mu$ g/ml sodium azide in PBS). After washing, sections were incubated for 2 h with the secondary antibody followed by washing, incubating in DAPI, and embedding.

**Ex utero electroporation.** Brain hemispheres from E14.5 embryos were dissected in ice-cold sterile Krebs buffer (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 11 mM glucose). *Ex utero* electroporation was performed as described previously (Yozu et al., 2005). In brief, <1  $\mu$ l of a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l miRNA solution was pressure injected into the ventricular zone of the MGE, followed by electroporation of two pulses of 100 ms duration and 100 V using a BTX ECM 830 (Harvard Apparatus).

**Outgrowth assay.** After *ex utero* electroporation, MGE were dissected in methyl cellulose medium (MC) (0.4 g of methyl cellulose, 5% FBS, 1%

penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 0.1% glucose) and cut in 200  $\times$  200  $\mu$ m pieces using a tissue chopper. The MGE explants were precultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 1 h, embedded in chicken plasma that was cross-linked with thrombin, and cultured in MC medium for 2 DIV before fixation with 4% PFA in PBS. Before analyzing, we made certain that there were transfected cells in the explant and that the outgrowth of nontransfected cells was normal.

**Slice cultures.** After *ex utero* electroporation, hemispheres were embedded in 30% low-melt agarose in PBS, cut into 250  $\mu$ m slices using a vibratome, and kept in Krebs buffer for postholding sections (supplemented with 10 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin, and 0.1 mg/ml gentamicin) on ice. Slices were transferred on membranes (Whatman) lying on neurobasal medium (supplemented with 2% B-27, 1% penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, and 0.5% glucose), and cultured for 3 DIV at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> before fixation with 4% PFA in PBS.

**In utero electroporation.** Timed pregnant female mice were treated with 4 mg/kg Carprofen for 30 min before deeply anesthetizing with a mixture of fentanyl (0.05 mg/kg), midazolam (5 mg/kg), and metomidine (0.5 mg/kg). Afterward the uterine horns were exposed. Various constructs (1  $\mu$ l of total volume, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l DNA plus 2% fast green to monitor the injection) were injected into the lateral ventricles of the embryos and electroporation (5 pulses at 40 V, 100 ms duration) was performed with a forceps electrode connected to a BTX ECM 830 (Harvard Apparatus). After 2 d *in utero*, brains were fixed in 4% PFA in PBS and cryosections were made, followed by immunostaining against GFP.

**Cell analysis.** The transfected cells were scanned with a Zeiss LSM 510 and analyzed using ZEN 2009 software. Cells from at least three independent experiments were examined.

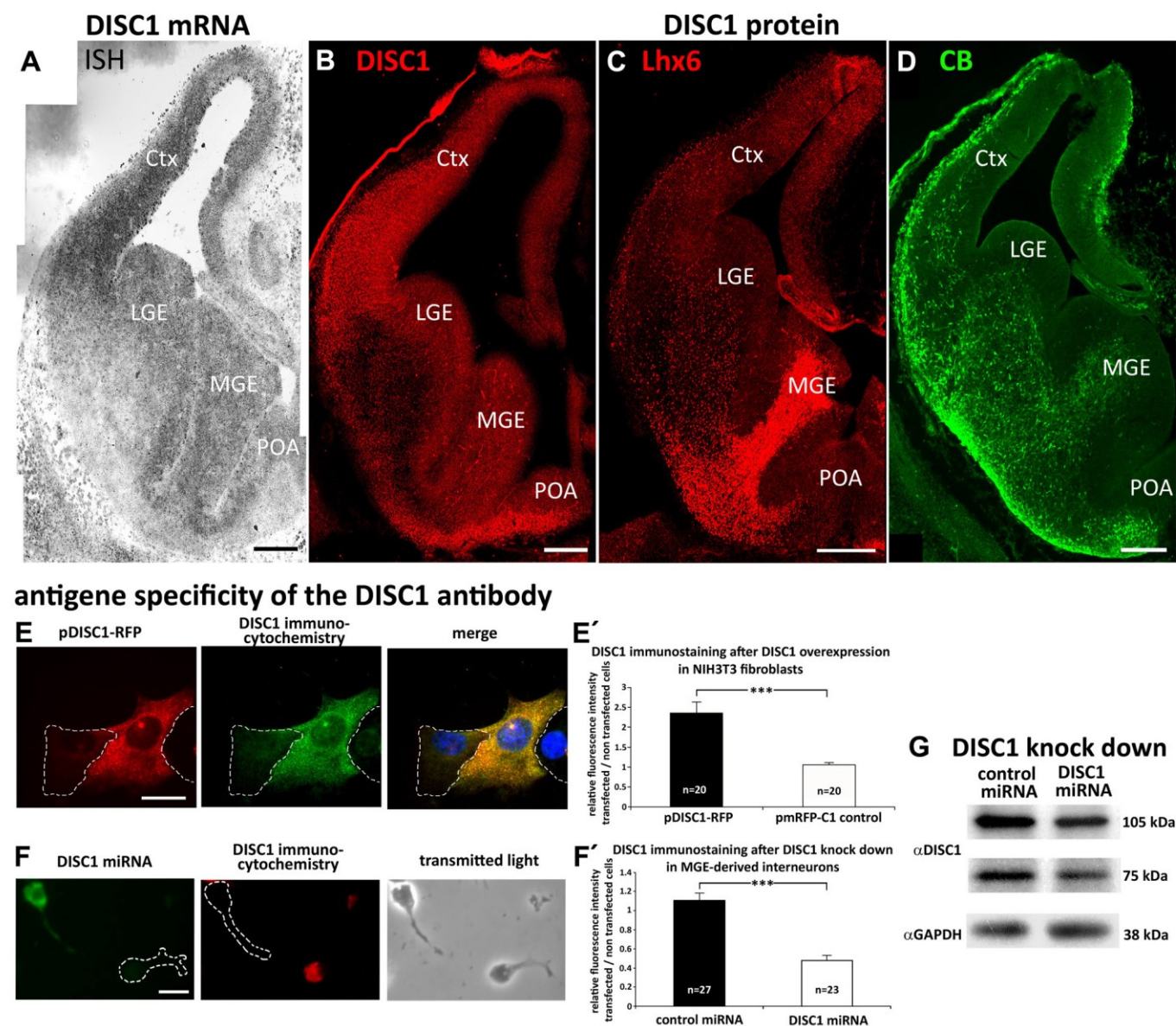
## Results

### DISC1 is expressed in MGE-derived interneurons

We first used RT-PCR on MGE tissue isolated from E14.5 embryos to examine the expression of DISC1 mRNA in this subdivision of the subpallium. As a positive control, we used adult hippocampus, where DISC1 remains highly expressed (Austin et al., 2004). RT-PCR showed similar signals in these two brain regions (data not shown). To analyze the spatial distribution of DISC1 transcripts in the telencephalon, we performed *in situ* hybridizations. As illustrated in Figure 1A, DISC1 mRNA was detected in the cerebral cortex with highest expression levels in the ventricular zone (VZ) and the subventricular zone (SVZ), consistent with previous findings (Ma et al., 2002; Austin et al., 2004). In the basal telencephalon, DISC1 transcripts were found in the VZ and SVZ of the lateral ganglionic eminence (LGE), MGE, and the POA (Fig. 1A).

Next, we wanted to examine the distribution of DISC1 at the protein level. We first tested the antigen specificity of the DISC1 antibody. For this, NIH3T3 fibroblasts were transfected with pmRFP-DISC1 or pmRFP-C1 (control) and immunostainings were performed. The exogenous DISC1 completely overlapped with the immunocytochemical signal (Fig. 1E). Analysis of the mean gray values showed a significant increase of the DISC1 signal in cells overexpressing DISC1 compared with cells expressing RFP only (Fig. 1E'). In addition, we performed immunostainings with dissociated MGE cells that were transfected with either control miRNA or DISC1 miRNA (Fig. 1F) to downregulate endogenous DISC1. Compared with control transfected interneurons, there was a significant decrease in the DISC1 signal in cells transfected with DISC1 miRNA (Fig. 1F'). Together, these findings indicate that the antibody reacts with both endogenous and exogenous DISC1 protein. We then used this antibody to perform Western blot analysis to quantify the knockdown efficiency of the DISC1 miRNA. Compared with control miRNA, the knockdown was not complete, but it suppressed ~65% of both DISC1 isoforms known in mice (Fig. 1G).



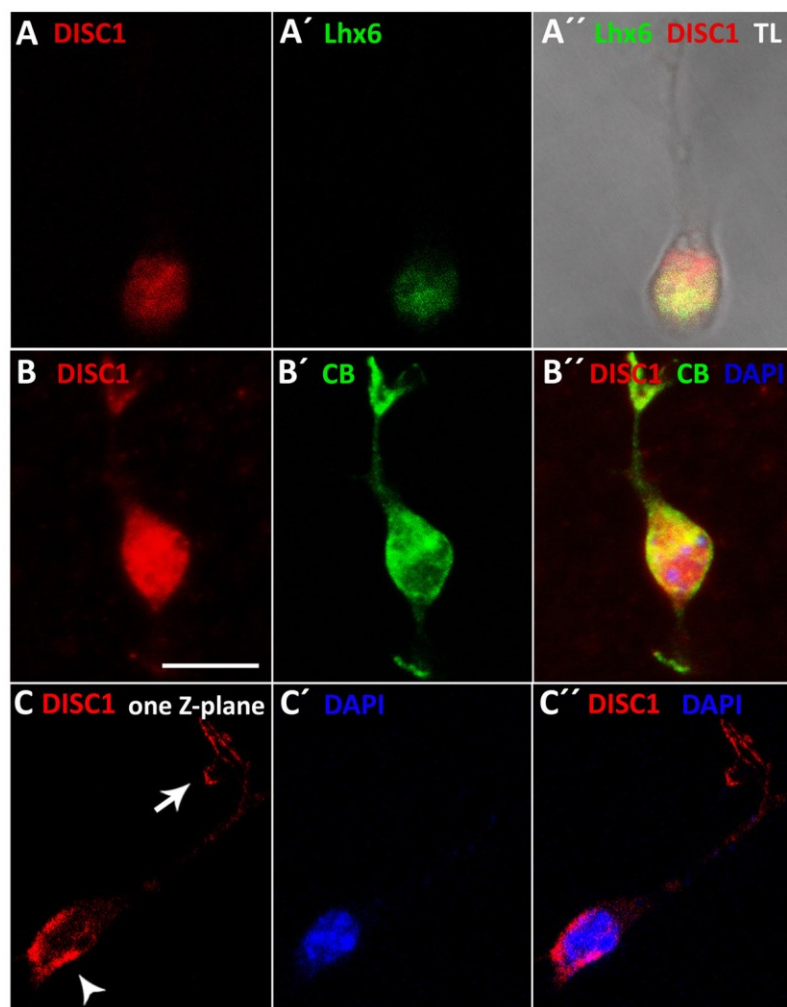


**Figure 1.** DISC1 mRNA and protein is expressed in E14.5 brains. **A**, *In situ* hybridization (ISH) demonstrates the expression of DISC1 mRNA in the cortex (Ctx), MGE, LGE, and POA of E14.5 embryos. **B–D**, Immunohistochemistry with E14.5 cryosections of DISC1 (**B**), Lhx6 (**C**), and CB (**D**). The DISC1 signal overlaps with both markers for interneurons. Scale bars, 200  $\mu$ m. **E–F**, Antigen specificity of the DISC1 antibody and knockdown of DISC1 by miRNA. Scale bars, 10  $\mu$ m. **E**, Immunocytochemistry with NIH3T3 fibroblasts transfected with pmRFP-DISC1. **E'**, Analysis of the mean gray value. There was a significant increase of the DISC1 signal in cells overexpressing DISC1 compared with cells expressing RFP only (RFP:  $1.07 \pm 0.05$ ; DISC1-RFP:  $2.36 \pm 0.28$ ; each 20 cells). **F**, Immunocytochemistry on MGE-derived cells transfected with DISC1 miRNA. **F'**, Comparison of the mean gray value. In interneurons transfected with DISC1 miRNA, the DISC1 signal was significantly decreased compared with control transfected cells (control miRNA:  $1.11 \pm 0.07$ , 27 cells; DISC1 miRNA:  $0.74 \pm 0.05$ , 23 cells). **G**, Western blot to quantify the DISC1 knockdown efficiency in NIH3T3 fibroblasts. \*\*\* $p < 0.001$ ;  $t$  test. Error bars are SEM.

We then performed immunostainings of E14.5 cryosections. Results indicated DISC1 protein expression in the basal telencephalon concentrated in the VZ and the SVZ of the MGE, LGE, and POA (Fig. 1B), which is consistent with the findings of the *in situ* hybridization (Fig. 1A). In the SVZ of the basal telencephalon, the distribution of DISC1-immunoreactive cells overlapped with Lhx6-positive neurons (Fig. 1C), a transcription factor that is expressed in the vast majority of MGE neurons that migrate to the pallidum (Alifragis et al., 2004), and calbindin (CB)-positive neurons (Anderson et al., 1997). To confirm a coexpression of DISC1 with interneuron markers on a cellular level, we used dissociated MGE-derived cells to perform double immunostainings. As shown in Figure 2, first and second lane, DISC1 is expressed in Lhx6-positive as well as CB-positive cells.

Immunocytochemistry also allowed us to identify the subcellular distribution of DISC1. Previous studies demonstrated that the subcellular expression pattern of DISC1 is complex and cell type-specific. Endogenous DISC1 has been found within the nuclei of certain cell types (Sawamura et al., 2008), the cytoplasm, where it colocalizes with centrosomal proteins or F-actin (Morris et al., 2003), and also in the growth cones, the tips of growing axons (Shinoda et al., 2007). In MGE-derived interneurons, we found that DISC1 is consistently expressed in the cell body and in most cases also in the tips of cell processes, particularly in the filopodia of the leading process (Fig. 2C, arrow). In migrating interneurons, the cell body consists of a very thin layer of cytoplasm surrounding the nucleus. Confocal imaging of DISC1-immunoreactive cells counterstained with the nuclear marker DAPI revealed that in the cell body, DISC1 was typically confined





**Figure 2.** DISC1 is expressed in MGE-derived cortical interneurons. **A, B**, Dissociated cells from the MGE of E14.5 embryos show that DISC1 is coexpressed with Lhx6 (**A**) and CB (**B**). **C**, Analysis of single Z-planes reveals that DISC1 is concentrated behind the nucleus (arrowhead). In addition, DISC1 is also concentrated in the tips of the leading process (arrow). Scale bar, 10  $\mu$ m, TL, Transmitted light.

to the cytoplasm of the cell body. In several cases, however, DISC1 was not evenly distributed in the cytoplasm around the cell nucleus, but was concentrated at the rear of the nucleus, opposite to the leading process (Fig. 2C, arrowhead). This subcellular distribution of DISC1 suggests that it might play a functional role in the migration of these neurons, for example by influencing nuclear translocation or the correct formation of leading processes.

#### DISC1 knockdown leads to migration deficits in MGE-derived neurons

To test the hypothesis that DISC1 is involved in the migration of MGE-derived cells, we first performed a cell migration assay combined with DISC1 RNA interference. For this, brain hemispheres of E14.5 embryos were *ex utero* electroporated with either a DISC1 miRNA vector or a control vector expressing control miRNA. Both vectors coexpressed EmGFP to visualize the transfected cells. After electroporation, small tissue blocks from the MGE were prepared and cultured for 2 d in a 3D matrix of cross-linked chicken plasma that allowed cell migration out of these explants. In this assay, downregulation of DISC1 with miRNA decreased the number of cells exiting the explants by 62% com-

pared with cells transfected with control miRNA (from  $4.7 \pm 0.6$  cells to  $1.8 \pm 0.4$  cells per explant; Fig. 3A,B,C).

We next attempted to rescue the migration defects after DISC1 knockdown by coelectroporation DISC1 miRNA with expression constructs of human DISC1 (hDISC1), which are insensitive to the miRNA (Young-Pearse et al., 2010). As an additional control, we also coelectroporated DISC1 miRNA with expression constructs of murine DISC1 (mDISC1), which are susceptible to the miRNA. As illustrated in Figure 3C, after coexpression of DISC1 miRNA with mDISC1, the number of cells migrating out of MGE explants was still reduced compared with control conditions. In fact, there was no difference in the impaired migration between MGE cells transfected with DISC1 miRNA alone and cells cotransfected with mDISC1 plasmids, suggesting that DISC1 miRNA efficiently interferes with endogenous and exogenous murine DISC1. In contrast, coelectroporation of DISC1 miRNA with hDISC1 increased the number of interneurons leaving the explants by 67%, from  $1.80 \pm 0.18$  (DISC1 miRNA + mDISC1) to  $3.02 \pm 0.27$  cells per explant (DISC1 miRNA + hDISC1). This indicates that hDISC1 significantly rescued the effects of DISC1 knockdown, although the rescue was not complete.

Next, we wished to examine directly how DISC1 knockdown affects interneuron migration in the basal telencephalon. It has been reported that ganglionic eminences can be specifically electroporated *in utero* by adjusting the angle of electrode paddles relative to the horizontal plane of the brain (Borrell et al., 2005). However,

as others previously noticed (Gelman et al., 2009), we found that it is not possible to restrict *in utero* electroporation to MGE cells and most attempts result in transfections of cells either scattered throughout the entire subpallium or more or less focused clusters of transfected cells at random places in the basal telencephalon. Thus, when these brains are analyzed a few days after *in utero* electroporation, it is virtually impossible to know the exact origin of the transfected cells. We therefore used an *ex utero* electroporation approach, where brains were first removed from E14.5 embryos and miRNA plasmid solution was then pressure injected directly into the MGE before electroporation (Yozu et al., 2005). Adding Alexa 546 as a fluorescent marker to the miRNA solutions, we confirmed that the injections were spatially restricted to the MGE. We then prepared slice cultures from the *ex utero* electroporated brains, kept them for 3 DIV, and analyzed the distribution of the migration pattern of the transfected MGE cells (scheme Fig. 4A).

In slices prepared from *ex utero* electroporated brains, after 3 DIV, there was still a dense focus of transfected cells in the MGE, which made it difficult to quantify the exact number of these neurons. However, transfected MGE cells that had migrated to the LGN and transfected neurons that had continued their migra-

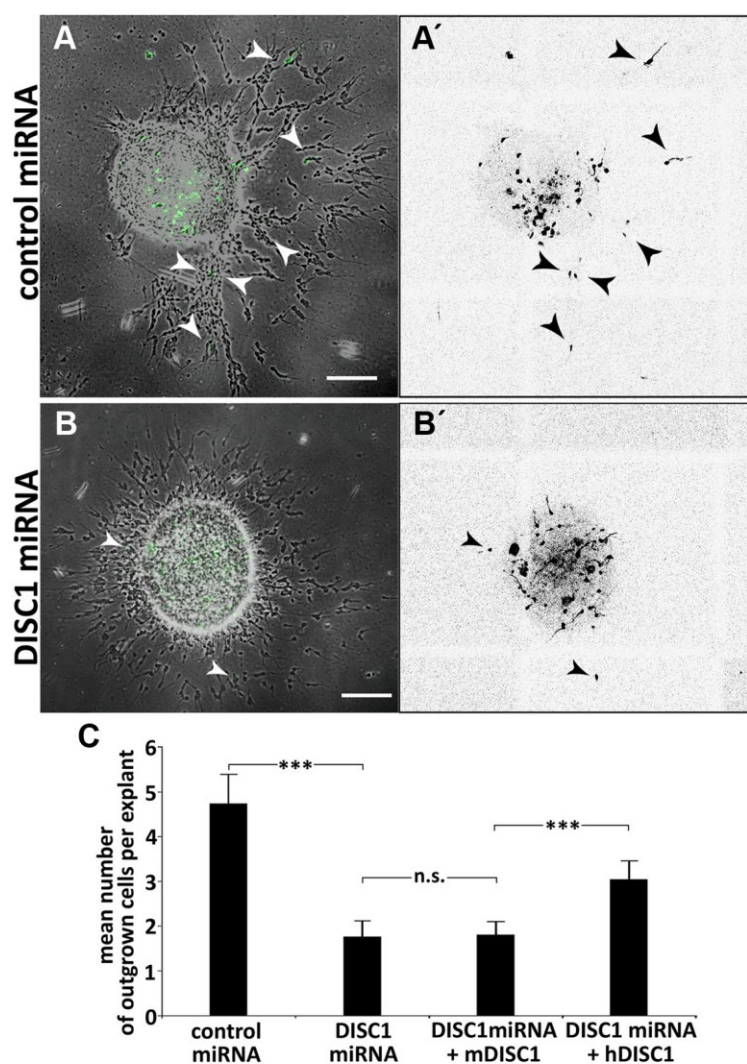


tion to the cortex were clearly discernable. We therefore compared the number of cells transfected with DISC1 miRNA or control miRNA that had migrated from the MGE to the LGE with those that continued their migration to the cortex in each slice culture. The total number of labeled cells in the LGE and cortex was set as 100%. After transfection with control miRNA, 58% of the labeled cells were found in the LGE while 42% of the labeled cells continued their migration to the cortex. In contrast, after transfection with DISC1 miRNA, 75% were found in the LGE and only 25% reached the cortex (Fig. 4B–D). Thus, reduction of DISC1 in MGE neurons strongly impairs their tangential migration toward the cerebral cortex.

### DISC1 depletion changes the morphology of migrating interneurons

The migration of cortical interneurons is a complex process that goes along with distinct morphological changes. It is known that the leading process stops growing while the nucleus moves forward. When nucleokinesis was blocked or reduced, interneurons exhibited prolonged leading processes (Bellion et al., 2005). We therefore measured the length of the leading process of transfected cells in the outgrowth assay as well as in the slice cultures. In both assays, the length of the leading processes from DISC1-deficient cells were significantly longer than that of control transfected cells (Fig. 5A–D, G). Abnormally prolonged leading processes were not observed when DISC1 miRNA was cotransfected with hDISC1 ( $40.49 \pm 1.67 \mu\text{m}$  for control transfected cells;  $35.65 \pm 1.76 \mu\text{m}$  for DISC1 miRNA + hDISC1 transfected cells). As expected, there was no rescue effect for leading process length when cells were cotransfected with mDISC1 (Fig. 5H).

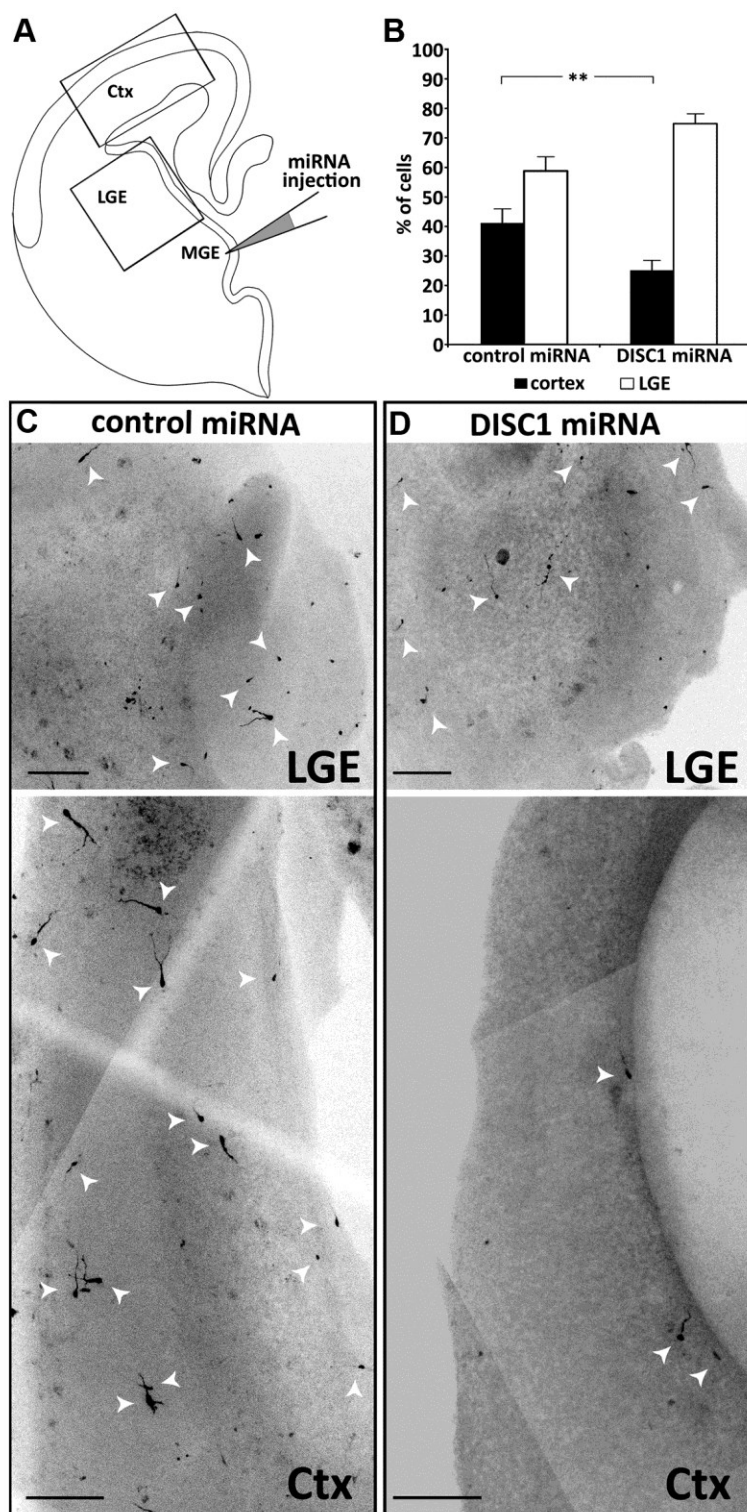
The leading processes of migrating interneurons are typically branched and it is generally assumed that they sample the environment for guidance cues (Martini et al., 2009). We therefore counted the number of side branches of cells transfected with DISC1 and control miRNA in both *in vitro* assays. We observed that control transfected cells branched significantly more often than DISC1-deficient cells. The highest number of side branches in cells transfected with DISC1 miRNA was three, while control transfected cells had up to six branches (Fig. 5A–D). On average, control transfected cells had  $3.4 \pm 0.14$  branches; after DISC1 knockdown, the mean number of branches was reduced to  $2.05 \pm 0.12$  ( $p < 0.001$ ; Fig. 5I). After cotransfection of DISC1 miRNA with hDISC1, the number of side branches significantly increased compared with transfections with DISC1 miRNA alone ( $p < 0.001$ ; Fig. 5J). However, cotransfections of DISC1 miRNA with mDISC1 did not increase the number of side branches observed after DISC1 knockdown (Fig. 5J). Thus, precise expression levels of DISC1 seem neces-



**Figure 3.** DISC1 knockdown leads to migration defects in the outgrowth assay. **A, B**, Photomicrographs of MGE explants transfected with control miRNA (**A**) or DISC1 miRNA (**B**), arrows point to transfected neurons (fluorescence) that migrated out of the explants (transmitted light). **A', B'**, Inverted fluorescence pictures of **A** and **B** for better visualization of transfected cells. **C**, Quantitative analysis shows that the number of cells exiting the explants is reduced after DISC1 knockdown (control miRNA:  $4.7 \pm 0.6$  cells per explant,  $n = 84$  explants; DISC1 miRNA:  $1.8 \pm 0.4$  cells per explant,  $n = 82$  explants) that can be rescued by human but not mouse DISC1 (DISC1 miRNA + mDISC1:  $1.80 \pm 0.18$  cells per explant,  $n = 116$  explants; DISC1 miRNA + hDISC1:  $3.02 \pm 0.27$  cells per explant,  $n = 104$  explants; *t* test). \*\*\* $p < 0.001$ , *t* test; n.s.  $p \geq 0.05$ . Scale bars, 200  $\mu\text{m}$ . Error bars are SEM.

sary for the formation of appropriate leading processes in migrating cortical interneurons.

To directly compare these *in vitro* results with the *in vivo* situation, we performed *in utero* electroporation of E14.5 embryos using control and DISC1 miRNA and examined the brains after 2 d. As mentioned above, it is not possible to selectively transfect the MGE with this technique. We therefore restricted our morphometric analysis to cells that were still located in the MGE. Under these *in vivo* conditions, we could observe very similar morphological alterations as in the *in vitro* assays. MGE cells transfected with DISC1 miRNA had a leading process that was almost twice as long as in control transfected neurons ( $55 \pm 7 \mu\text{m}$  compared with  $28 \pm 2 \mu\text{m}$ ; Fig. 5E–G). We also observed a modified branching pattern in DISC1-deficient cells after *in utero* electroporation. Over 90% of these cells had unbranched processes and the remaining cells had only one side branch. In contrast, approximately half of the control transfected cells had two or more side branches. The average number of branches was



**Figure 4.** Focal DISC1 knockdown in the MGE leads to migration defects in slice cultures. **A**, Schematic drawing showing the injection of miRNA solution into the MGE of whole hemispheres followed by electroporation. The hemispheres were sliced and kept for 3 DIV. Rectangles indicate the regions of the photomicrographs shown below. **B**, Quantification of the number of cells which migrated to the LGE and cells that migrated further to the cortex (Ctx). Under control conditions, significantly more cells reached the cortex compared with DISC1 knockdown slices (control miRNA:  $41.2 \pm 4.7\%$  cells in the cortex,  $n = 17$ ; DISC1 miRNA:  $25.2 \pm 3.2\%$  cells in the cortex,  $n = 24$ ;  $t$  test:  $**p < 0.01$ ). **C–D**, Photomicrographs from cortex and LGE of control miRNA (**C**) and DISC1 miRNA (**D**) transfected slices. Scale bars, 200  $\mu$ m. Error bars are SEM.

$2.7 \pm 0.2$  for control transfected cells and  $1.1 \pm 0.1$  for DISC1 miRNA transfected cells ( $p < 0.001$ ; Fig. 5E–F, I).

Together, the *in vitro* assays demonstrate that DISC1 knockdown leads to migratory deficits that correlate with specific

changes in cell morphology. The fact that the same morphological alterations after DISC1 suppression also occurred *in vivo* strongly suggests that DISC1 is a necessary component for the correct migration of interneurons in the intact brain.

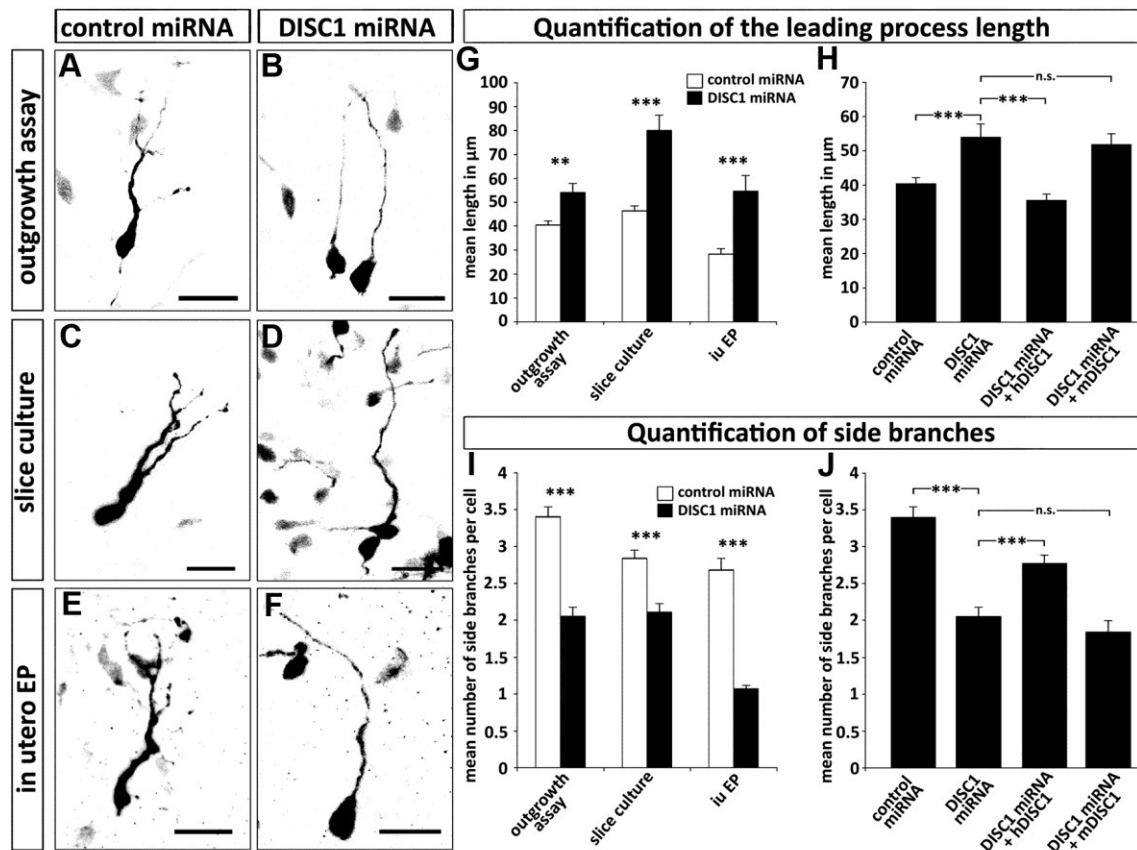
## Discussion

In this study, we found that transcripts of the psychiatric illness risk gene *DISC1* are expressed in the MGE, a major source of cortical interneurons. DISC1 protein was detected in MGE neurons that coexpress the early interneuron markers *Lhx6* and *CB*. In these neurons, DISC1 is concentrated in the tips of the leading process and its branches as well as in the somatic cytoplasm. Downregulation of DISC1 via miRNA increased the length of the leading process and at the same time decreased the number of side branches in MGE-derived interneurons. Finally, cell migration assays revealed that DISC1 is a necessary component for the correct tangential migration of interneurons to the cerebral cortex.

Several previous studies have implicated DISC1 in regulating neuronal migration. For example, after *in utero* electroporation of DISC1 shRNA in cortical precursor cells in the ventricular zone, which gives rise to pyramidal neurons, transfected cells were retained in the intermediate zone and failed to migrate into the cortical plate (Kamiya et al., 2005). In contrast, knockdown of DISC1 in newly generated granule cells in the adult hippocampus resulted in an overextended migration (Duan et al., 2007; Enomoto et al., 2009; Kim et al., 2009). It has therefore been suggested that DISC1 does not directly mediate neuronal migration but rather relays positional cues to the migratory machinery (Duan et al., 2007). Consistent with this view, a recent study demonstrated that NMDA receptor antagonists in adult mice lead to an overextension in migration of newborn granule cells and a concomitant reduction in DISC1 expression (Namba et al., 2011). This overextended migration induced by NMDA receptors was rescued by exogenous expression of DISC1, demonstrating that extracellular signals can regulate DISC1 levels and thereby influence neuronal migration. In the present study, we found that after DISC1 suppression in the MGE, interneurons were able to migrate to the LGE and further to the cortex.

However, the portion of DISC1-deficient MGE cells that reached their final destination in the cortex was much lower than in control transfected MGE neurons. Thus, DISC1 does not seem to control the positioning of





**Figure 5.** DISC1 knockdown leads to alterations in the morphology of MGE-derived interneurons. **A–F**, Photomicrographs of cells transfected with control miRNA or DISC1 miRNA in outgrowth assays (**A, B**), slice cultures (**C, D**), and after *in utero* electroporation (**E, F**). **G–J**, Quantification of cell morphology. Under all experimental conditions, DISC1-deficient cells show longer, but less branched leading processes (**G, I**). Cotransfection of miRNA with mDISC1 or hDISC1 in the outgrowth assay shows that the effect of DISC1 knockdown can be rescued by a miRNA insensitive DISC1 (**H, J**). For statistical analysis, the means were compared with a Student's *t* test. Outgrowth assay: leading process length: control miRNA, 41  $\pm$  2  $\mu\text{m}$ ; DISC1 miRNA, 54  $\pm$  4  $\mu\text{m}$ ; DISC1 miRNA + mDISC1, 52  $\pm$  3  $\mu\text{m}$ ; DISC1 miRNA + hDISC1, 36  $\pm$  2  $\mu\text{m}$ ; number of side branches: control miRNA, 3.4  $\pm$  0.1; DISC1 miRNA, 2.1  $\pm$  0.1; DISC1 miRNA + mDISC1, 1.85  $\pm$  0.15; DISC1 miRNA + hDISC1, 2.77  $\pm$  0.11; control miRNA,  $n$  = 127 neurites from 30 cells; DISC1 miRNA,  $n$  = 60 neurites from 30 cells; DISC1 miRNA + mDISC1,  $n$  = 33 neurites from 21 cells; DISC1 miRNA + hDISC1,  $n$  = 71 neurites from 24 cells. Slice culture: leading process length: control miRNA, 46  $\pm$  2  $\mu\text{m}$ ; DISC1 miRNA, 80  $\pm$  6  $\mu\text{m}$ ; number of side branches: control miRNA, 2.8  $\pm$  0.1; DISC1 miRNA, 2.1  $\pm$  0.1; control miRNA,  $n$  = 92 neurites from 30 cells; DISC1 miRNA,  $n$  = 66 neurites from 30 cells. *In utero* electroporation: leading process length: control miRNA, 28  $\pm$  2  $\mu\text{m}$ ; DISC1 miRNA, 55  $\pm$  7  $\mu\text{m}$ ; number of side branches: control miRNA, 2.7  $\pm$  0.2; DISC1 miRNA, 1.1  $\pm$  0.1; control miRNA,  $n$  = 53 neurites from 18 cells; DISC1 miRNA,  $n$  = 28 neurites from 26 cells. \*\*\* $p$  < 0.001; \*\* $p$  < 0.01; n.s.  $p$  > 0.05, *t* test. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ . Error bars are SEM.

cortical interneurons, but rather directly interferes with the ability of these neurons to migrate properly.

The dynamic behavior of different classes of migrating neurons has been described in detail (for review, see Ayala et al., 2007). The molecular mechanisms underlying these distinct cellular events, however, are still under debate. Alterations in the cytoskeletal proteins tubulin and actin, motor proteins of the dynein and kinesin family, and numerous regulatory proteins have been implicated to control the migration of diverse populations of neurons.

The subcellular distribution of DISC1 in MGE neurons and the morphological alterations after DISC1 knockdown in these cells provide some clues how DISC1 might contribute to the migration of cortical interneurons. In migrating MGE neurons, before the initiation of nucleokinesis, actin, and the nonmuscle myosin II accumulate at the rear of the cell, forming a cup-like structure (Bellion et al., 2005). Blocking myosin II with belbistatin reduced nuclear movement, suggesting that contraction of actin-myosin at the rear pushes the nucleus forward and presumably breaks adhesion and the trailing process at the cell rear. Since DISC1 is often localized in a cup-like shape at the trailing edge of MGE neurons, DISC1 might interact with F-actin and/or myosin motors. A colocalization of DISC1 with actin filaments and actin

binding proteins has been reported previously (Morris et al., 2003).

We found that DISC1 is consistently expressed in the tips of the leading processes of MGE-derived interneurons. It has been suggested that dynein anchored in the membrane of the leading process is pulling microtubules attached to the centrosome and leading process. Recent work with migrating pyramidal neurons has shown that microtubule plus-end binding protein adenomatous polyposis coli (APC) is required to anchor microtubules to the distal end of the leading process (Asada and Sanada, 2010). If the localization of APC to the distal tips of the leading process is prevented, radial migration is impaired and the neurons exhibited longer leading processes. For migrating interneurons, where DISC1 is localized in the tips of the leading process, DISC1 might be involved in the attachment of microtubules to the distal ends of these neurites. This could explain why MGE neurons after DISC1 knockdown, in addition to their migratory deficits, also exhibit prolonged leading processes.

Obviously, the precise mechanisms how DISC1 is involved in interneuron migration remain to be determined. However, our results indicate that DISC1 has an impact on the migratory behavior of interneurons during early development that might lead to deficits in the number or composition of GABAergic neurons

in the cortex. Dysfunctions of local GABAergic circuits have often been associated with the pathophysiology of schizophrenia (Benes and Berretta, 2001; Lewis et al., 2005). Thus, our findings support the notion that schizophrenia is a neurodevelopmental disease that may result at least in part from defects in neuronal integration (Lewis and Levitt, 2002).

## References

- Alifragis P, Liapi A, Parnavelas JG (2004) *Lhx6* regulates the migration of cortical interneurons from the ventral telencephalon but does not specify their GABA phenotype. *J Neurosci* 24:5643–5648.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474–476.
- Asada N, Sanada K (2010) LKB1-mediated spatial control of GSK3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli contributes to centrosomal forward movement and neuronal migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 30:8852–8865.
- Austin CP, Ky B, Ma L, Morris JA, Shughrue PJ (2004) Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience* 124:3–10.
- Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128:29–43.
- Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Métin C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25:5691–5699.
- Benes FM, Berretta S (2001) GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25:1–27.
- Borrell V, Yoshimura Y, Callaway EM (2005) Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation. *J Neurosci Methods* 143:151–158.
- Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A (2009) Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci* 29:12768–12775.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130:1146–1158.
- Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K, Takahashi M (2009) Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63:774–787.
- Gelman DM, Martini FJ, Nóbrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marín O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29:9380–9389.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7:1167–1178.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL (2009) DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* 63:761–773.
- Lewis DA, Levitt P (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25:409–432.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312–324.
- Ma L, Liu Y, Ky B, Shughrue PJ, Austin CP, Morris JA (2002) Cloning and characterization of Disc1, the mouse ortholog of DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1). *Genomics* 80:662–672.
- Marín O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2:780–790.
- Martini FJ, Valiente M, López Bendito G, Szabó G, Moya F, Valdeolmillos M, Marín O (2009) Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136:41–50.
- Métin C, Baudoin JP, Rakić S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23:894–900.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP (2003) DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12:1591–1608.
- Namba T, Ming GL, Song H, Waga C, Enomoto A, Kaibuchi K, Kohsaka S, Uchino S (2011) NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). *J Neurochem* 118:34–44.
- Sawamura N, Ando T, Maruyama Y, Fujimuro M, Mochizuki H, Honjo K, Shimoda M, Toda H, Sawamura-Yamamoto T, Makuch LA, Hayashi A, Ishizuka K, Cascella NG, Kamiya A, Ishida N, Tomoda T, Hai T, Furukubo-Tokunaga K, Sawa A (2008) Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. *Mol Psychiatry* 13:1138–1148, 1069.
- Shinoda T, Taya S, Tsuboi D, Hikita T, Matsuzawa R, Kuroda S, Iwamatsu A, Kaibuchi K (2007) DISC1 regulates neurotrophin-induced axon elongation via interaction with Grb2. *J Neurosci* 27:4–14.
- Valiente M, Marín O (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 20:68–78.
- Young-Pearse TL, Suth S, Luth ES, Sawa A, Selkoe DJ (2010) Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J Neurosci* 30:10431–10440.
- Yozu M, Tabata H, Nakajima K (2005) The caudal migratory stream: a novel migratory stream of interneurons derived from the caudal ganglionic eminence in the developing mouse forebrain. *J Neurosci* 25:7268–7277.
- Zimmer G, Garcez P, Rudolph J, Niehage R, Weth F, Lent R, Bolz J (2008) Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 28:62–73.

## Review Article

# GABA through the Ages: Regulation of Cortical Function and Plasticity by Inhibitory Interneurons

Konrad Lehmann, André Steinecke, and Jürgen Bolz

*Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie, Universität Jena, 07743 Jena, Germany*

Correspondence should be addressed to Jürgen Bolz, [jurgen.bolz@uni-jena.de](mailto:jurgen.bolz@uni-jena.de)

Received 13 January 2012; Revised 30 March 2012; Accepted 30 March 2012

Academic Editor: Maurice Ptito

Copyright © 2012 Konrad Lehmann et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inhibitory interneurons comprise only about 20% of cortical neurons and thus constitute a clear minority compared to the vast number of excitatory projection neurons. They are, however, an influential minority with important roles in cortical maturation, function, and plasticity. In this paper, we will highlight the functional importance of cortical inhibition throughout brain development, starting with the embryonal formation of the cortex, proceeding by the regulation of sensory cortical plasticity in adulthood, and finishing with the GABA involvement in sensory information processing in old age.

## 1. Introduction

The functioning of the cerebral cortex depends critically on the precise balance between excitatory and inhibitory neurotransmitter systems. Excitation is mediated via glutamate by pyramidal neurons, the projection neurons of the cortex, and by a special class of local neurons in cortical layer IV, the spiny stellate cells. Inhibition is mediated via  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by cortical interneurons, which regulate the degree of glutamatergic excitation, filtering the input and regulate the output of projection neurons. GABAergic interneurons, the “nonpyramidal cells” of the cerebral cortex, take many different forms of dendritic and axonal arborization, which have been used for their morphological classification ever since their first description by Ramon y Cajal [1–5]. Moreover, interneurons also differ in their firing patterns, the neuropeptides they express, their calcium-binding protein content, and other molecular markers such as ion channels, receptors, and transporters. Based on the combination of structural, functional, and biochemical criteria, interneurons have been subdivided into many different subclasses and it is still a matter of hot debate among the experts of how many interneuron subtypes exist in the cortices of different species [6–8].

At the circuit level, interneurons control the flow of information and synchronization in the cerebral cortex.

There are about five times more glutamatergic neurons than GABAergic neurons in the neocortex; this ratio is consistently observed across many mammalian species. This then suggests that the numerical balance of excitatory and inhibitory neurons may be important for normal brain function and behavior. Even though GABAergic interneurons comprise only a small fraction of the cells in the neocortex, disturbances in their development, and hence the delicate balance between excitation and inhibition, can lead to neurological or neuropsychiatric diseases such as epilepsy, autism, and schizophrenia (reviewed in [9–13]). These disorders often emerge during childhood and adolescence. However, as we will describe later in this paper, alterations in GABAergic interneuron can also occur in the adult and aging brain, with important repercussions for cortical function and plasticity.

## 2. Setting the Balance: Interneuron Migration into the Cortical Plate

Cortical projection neurons, the excitatory pyramidal cells, arise in the ventricular zone (VZ) of the dorsal telencephalon and then migrate radially to form the laminated neocortex [14]. In contrast, GABAergic interneurons originate from the VZ of the ventral telencephalon from three regions: different



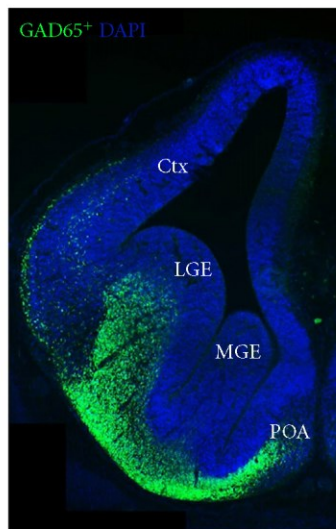


FIGURE 1: GABAergic interneurons are born in the basal telencephalon. Coronal cryosection of an E14 GAD65 EGFP mouse embryo. The MGE and the POA give rise to tangentially migrating cortical interneurons (green). GABAergic LGE-derived neurons migrate to the olfactory bulb, the striatum, and the lateral cortex. Ctx: cortex, MGE: medial ganglionic eminence, LGE: lateral ganglionic eminence, POA: preoptic area.

interneuron subtypes are generated in the medial ganglionic eminence (MGE), the caudal ganglionic eminence (CGE), and the preoptic area (POA) (see Figure 1). For example, parvalbumin positive and somatostatin-positive interneurons arise mainly from the MGE, while most calretinin-positive interneurons are born in the CGE and the POA gives birth to vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y-positive interneurons. Interneurons originating from these regions then migrate tangentially in separate streams over long distances towards their cortical destinations [15–22].

The cellular and molecular mechanisms that regulate and guide interneuron migration out of the ganglionic eminences and POA into the neocortex are beginning to be described. Different groups of signaling molecules, including semaphorins and slits, act as repulsive cues for migrating interneurons [23, 24]. On the other hand, two isoforms of neuregulin act as short- and long-term attractants that demarcate the migratory route of cortical interneurons [25]. Another group of signaling molecules that is expressed widely in the basal telencephalon during interneuron migration is the ephrins and their receptors, the Eph receptor tyrosine kinases. As will be described later, recent findings from our lab provided direct evidence for distinct roles of Eph/ephrin interactions in the guidance of cortical interneuron migration.

The mammalian Eph/ephrin system consists of a family of receptor tyrosine kinases subdivided into 9 EphAs and 5 EphBs. A-type receptors bind to all A-type ephrins (ephrinA1–5), which are tethered to the cell membrane by a GPI anchor. B-type receptors bind to all B-type ephrins (ephrinB1–3), which have a transmembrane domain that is followed by a short cytoplasmic region. An exception is

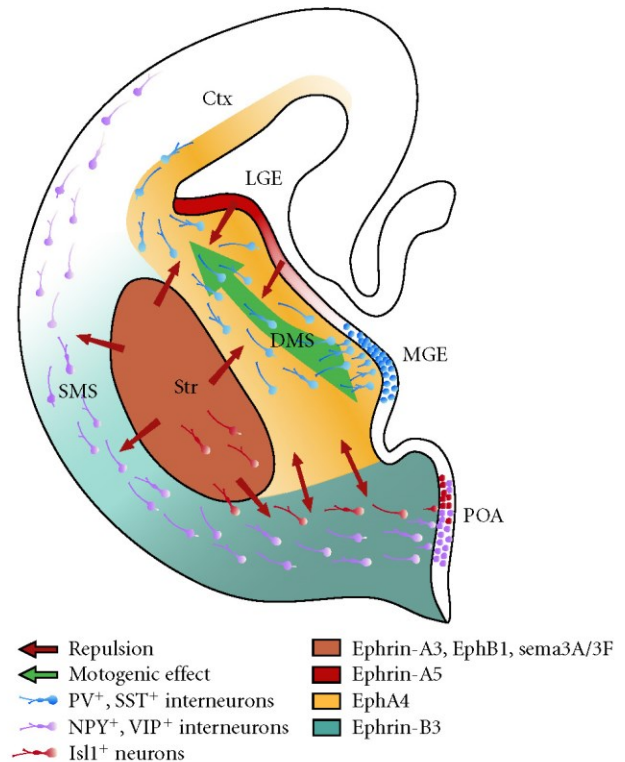


FIGURE 2: Different Eph/ephrin members act in concert to channel migrating MGE-derived neurons towards the cortex. Schematic drawing of a coronal brain slice from the right hemisphere; medial is right; dorsal is top. The MGE gives rise to parvalbumin-(PV-) and somatostatin-(SST-) positive interneurons. They are driven by EphA4 reverse signalling and guided by ephrin-A5, ephrin-A3, and Sema3A/3F forward signalling. The POA gives rise to neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal protein (VIP) as well as islet 1 (Isl1) positive interneurons that are guided by EphB1/ephrin-B3 signalling preventing the POA-derived cortical interneurons from entering the striatum (Str). The same Eph/ephrin signalling allows the Isl1+ neurons to migrate towards the Str. The MGE gives rise to the deep migratory stream (DMS) and the POA provides neurons for the superficial migratory stream (SMS). Those streams are divided by a bidirectional EphA4 and ephrin-B3 signalling.

EphA4, which can bind to both A-type and B-type ligands [26–28]. A distinctive feature of this signaling system is that an Eph receptor can also act as a ligand in the same manner that an ephrin ligand can act as a receptor. Ephrin binding induces Eph forward signaling; however, ephrins can also signal into the cell, which is called reverse signaling (for review, see [29–31]). Using a library of riboprobes for all members of the Eph/ephrin gene family, we systematically mapped with *in situ* hybridizations the complete set of these wiring molecules at different developmental stages. Our results revealed that many members of the Eph/ephrin system can be detected in the developing telencephalon and that they exhibit highly dynamic expression patterns [32, 33]. Based on the spatial and temporal expression patterns we could make some prediction about the potential roles of these wiring molecules in regulating the tangential migration of cortical interneurons. These hypotheses have then been

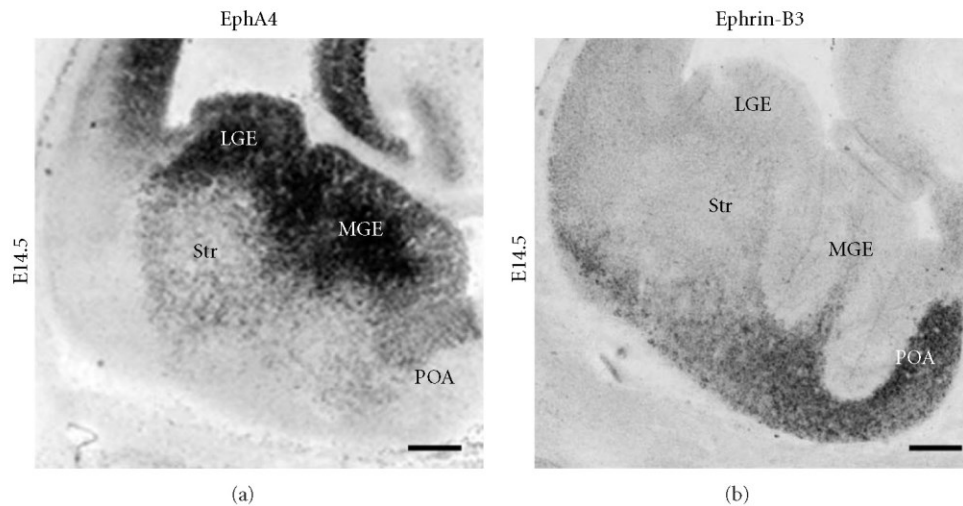


FIGURE 3: Complementary EphA4 and ephrin-B3 *in situ* hybridization expression patterns. On embryonic day E14.5 EphA4 and ephrin-B3 are complementary expressed in the basal telencephalon of mouse brains. Based on these expression patterns several predictions about the functional role of these wiring molecules on interneuron migration could be made (see text for details). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

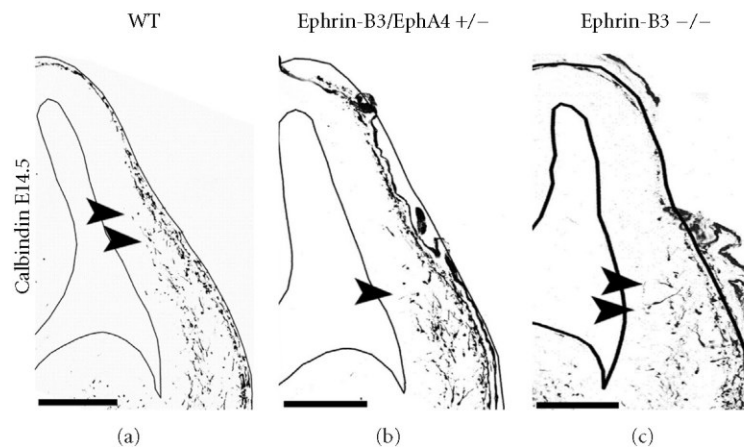


FIGURE 4: Alterations in the Eph/ephrin system cause a delayed migration of cortical interneurons *in vivo*. Analysing the calbindin-(CB-) positive interneurons in the cortex of E14.5 embryos revealed a delayed migration of interneurons in hetero- and homozygotic ephrin-B3/EphA4 knockout mice compared to the wild-type (WT) littermates. Arrow heads indicate the front of migrating interneurons. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

tested with different bioassays *in vitro* and in diverse gene-targeted mouse lines directly *in vivo*.

For example, we could demonstrate that ephrin-A3, which is expressed in the striatum, prevents migrating cortical interneurons from invading this inappropriate region [32]. We could also show that ephrin-A5 is expressed in the VZ of the ganglionic eminences, the dorsal boundary of the migratory route of MGE-derived interneurons, and that this molecule serves as an inhibitory border to channel these neurons into the subventricular zone [34]. Thus, as illustrated in Figure 2, the deep corridor of migrating cortical interneurons is at least in part defined by the concerted action of two different ephrin-A ligands, with ephrin-A5 flanking the dorsal portion and ephrin-A3 the ventral portion of this migratory stream.

These repulsive effects are mediated by the EphA4 receptor, which is expressed by cortical interneurons [32, 34].

As already mentioned above, particular interneuron subtypes are generated in a temporally regulated manner in the MGE, CGE, and POA of the basal telencephalon. We could reveal that POA- and MGE-derived cortical interneurons migrate within spatially segregated corridors. Ephrin-B3, expressed in POA-derived interneurons traversing the superficial route, acts as a repellent signal for deeply migrating interneurons born in the MGE, which is mediated by EphA4 forward signaling. In contrast, EphA4 induces repulsive ephrin-B3 reverse signaling in interneurons generated in the POA, restricting this population to the superficial path (Figure 3). Perturbation of this bidirectional ephrin-B3/EphA4 signaling *in vitro* and in ephrin-B3/EphA4 double mutants *in vivo* leads to a partial intermingling of cells in these segregated migratory pathways and—as shown in Figure 4—to a delayed migration of calbindin-positive interneurons to



the cortex. Thus cell contact-mediated bidirectional ephrin-B3/EphA4 signaling mediates the sorting of MGE- and POA-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream [33].

We could also demonstrate that EphA4-induced reverse signaling has a motogenic effect of MGE-derived interneurons. In these experiments we first used different *in vitro* assays for cell migration and found that recombinant EphA4 stimulates the migratory speed of cortical interneurons. Thus, in addition to its established role in providing cell-contact mediated repulsion, EphA4 can also tune the molecular machinery for neuronal migration. The ephrin ligands mediating EphA4 reverse signaling and the signal transduction cascade involved in this process are currently under investigation. However, in order to study the function of EphA4 on interneuron migration *in vivo*, we already examined cortical interneurons in an EphA4 knockout mouse line. We found that there was a delayed relocation of calbindin-positive interneurons into the cortex [35].

### 3. Disrupting Interneuron Migration by Disrupted-in-Schizophrenia 1

Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is a prominent susceptibility gene for major psychiatric disorders [36, 37]. The biological functions attributed to the DISC1 protein are complex and highly diverse. For example, previous work suggested that DISC1 plays an important role during neuronal proliferation, differentiation, neurite outgrowth, and synapse formation (reviewed in [38, 39]). There are also some studies that report that DISC1 is a necessary component for the correct positioning of radially migrating cortical pyramidal neurons [40, 41]. This prompted us to study the potential role of DISC1 for interneuron migration.

For this we first performed RT-PCR, *in situ* hybridization and immunostainings to verify that DISC1 is expressed in the MGE at the appropriate developmental stages. We also examined the subcellular distribution of DISC1. As illustrated in Figure 5, DISC1 is expressed in the tips of the leading processes. In addition, we also found DISC1 immunoreactivity at the rear of the nucleus, opposite to the leading process. A closer inspection revealed that DISC1 colocalizes with LIS1, previously described as a centrosomal protein [42] (Figure 6). Thus DISC1 is found in important strategic positions to control the molecular machinery involved in interneuron migration, for example, by interacting with cytoskeletal proteins tubulin and actin, motor proteins of the dynein and kinesin family, and regulatory proteins [40, 43].

To examine the functional role of DISC1 during interneuron migration, we performed *in utero* and *ex utero* electroporation to suppress DISC1 in the MGE *in vivo* and *in vitro*. Our results indicate that, after DISC1 knockdown, the proportion of tangentially migrating MGE neurons that reached their cortical target was reduced by 15%. In addition, there were profound alterations in the morphology of DISC1-deficient neurons, which exhibited longer and less branched leading processes than control cells [44].

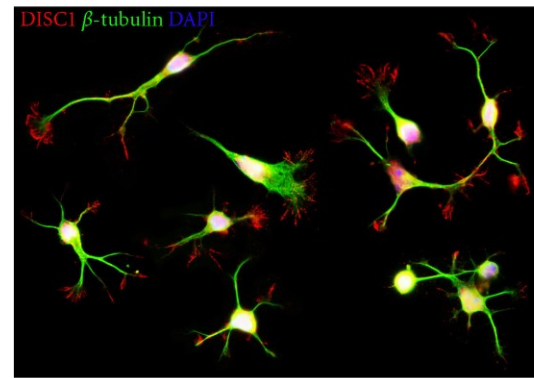


FIGURE 5: DISC1 immunocytochemistry on MGE-derived interneurons. Photomicrograph of MGE-derived neurons immunostained with DISC1 antibodies (red) and  $\beta$ -Tubulin antibodies (green) show a strong DISC1 signal in the processes of the interneurons.

These results indicate that DISC1 has an impact on the migratory behaviour of interneurons during early development that might lead to deficits in the number and/or composition of GABAergic neurons in the cortex. As mentioned in Section 1, dysfunctions of local GABAergic circuits have been often associated with the pathophysiology of schizophrenia [12]. Thus our findings support the notion that schizophrenia is a neurodevelopmental disease that may result from defects in interneuron integration [45].

### 4. Inhibitory Regulation of Sensory Cortical Plasticity

Vulnerability for psychiatric diseases is not uniform throughout life, but is increased during certain stages of pre- and postnatal development [46, 47]. The factors that make neuronal subsystems especially open for environmental influences during well-defined, so-called critical periods have been the subject of much research in the neurosciences. As a typical example, the binocular visual cortex exhibits a well-studied critical period during which, under undisturbed conditions, the orientation preferences for stimuli seen through one versus the other eye are harmonised in visual cortical neurons [48]. It has long been known that temporary closure (i.e., monocular deprivation) of one eye during this critical period will shift the excitability of cortical neurons towards the open eye [49, 50]. This critical period for ocular dominance plasticity starts a few days after eye opening in mice, has a maximum at about postnatal day 28, and ends at around postnatal day 32, when short periods of deprivation have no detectable effect in the cortex [50]. Longer periods of deprivation, however, are still able to induce ocular dominance plasticity until postnatal day 100 (P100), but no longer (Figure 7, [51]).

The mechanisms regulating this period of enhanced plasticity have been the subject of intense research for many years. It has become obvious that the critical period is initiated by a shift in the cortical balance of excitation and

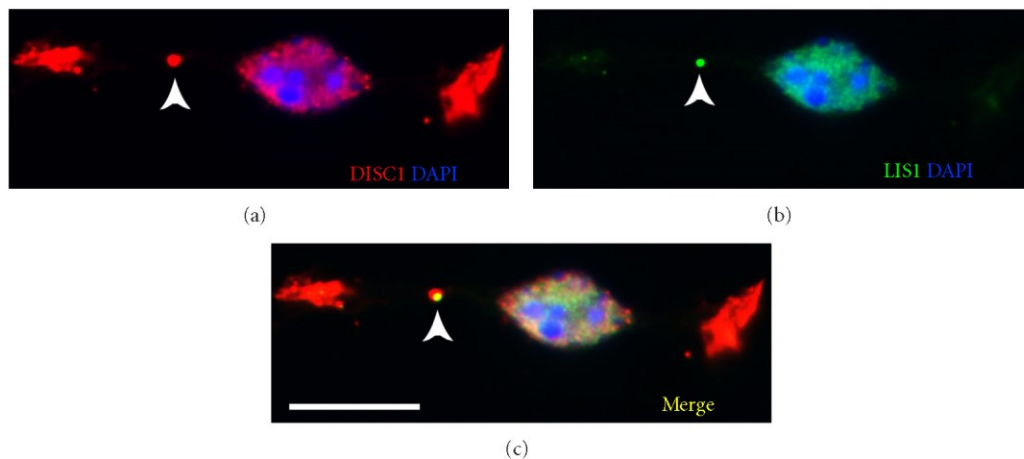


FIGURE 6: DISC1 and LIS1 immunocytochemistry on MGE-derived cells. Photomicrograph of an MGE-derived cell that was coimmunolabeled with a DISC1 antibody (a) and a LIS1 antibody (b). (c) represents the merged picture of (a) and (b). Note the precise overlap of DISC1 and LIS1 at the centrosome (yellow in c) pinpointed by the arrow heads. Scale bar: 10  $\mu$ m.

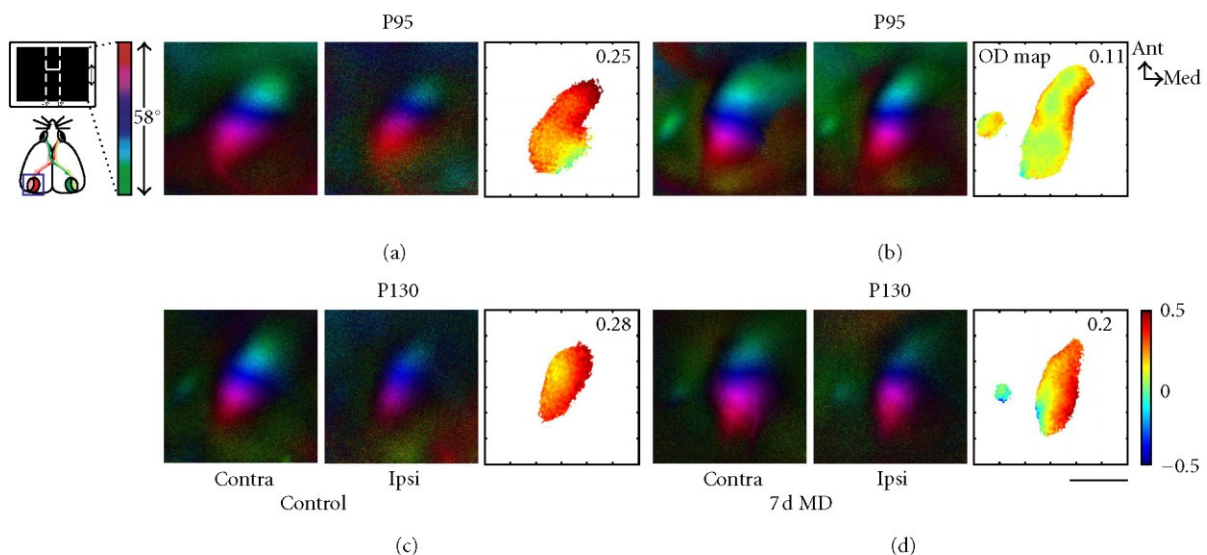


FIGURE 7: Adult ocular dominance plasticity ceases at postnatal day (P) 100. Retinotopic maps of the binocular visual cortex are shown. Elevation is colour coded according to the scheme on the left. Polar maps obtained by stimulation of the contralateral (contra) or ipsilateral (ipsi) eye are illustrated for four representative mice. Ocular dominance (OD) in the visual cortex is shown in the OD maps on the right, colour-coded according to the scheme on the right. In nondeprived control mice both before (a) and after (c) P100, the contralateral eye activates the cortex more strongly than the ipsilateral eye, which is reflected in warm-coloured OD maps. Seven days of monocular deprivation shift OD towards the ipsilateral eye in P95 animals ((b), colder colours of OD map), but have no such effect in the P130 animal (d). Scale: 1 mm.

inhibition [52, 53] (see [54] for review), a shift that is effected by the maturation of fast-spiking GABAergic interneurons, the so-called basket cells which are characterised by their expression of parvalbumin [55]. Thus, the start of the critical period is delayed in knockout mice lacking the GABA synthesising enzyme GAD65 and is triggered in these mice as soon as inhibition at GABA<sub>A</sub> receptors is increased by the intracerebral infusion of diazepam [52]. Enhanced inhibition in early childhood prepones the start of the critical period [53, 56, 57]. On the other hand, several interventions have been shown in recent years to reinstate

critical period-like plasticity in adult animals by reducing intracortical inhibition: treatment with the antidepressant fluoxetine allows for ocular dominance plasticity in adult rats [58]; the effect is accompanied by reduced cortical GABA levels and prevented by diazepam infusion. Additionally, fluoxetine treatment promotes the recovery from amblyopia of adult rats [58]. The same holds true for environmental enrichment, and again diazepam infusion averts the effect [59]. Indeed, directly attenuating GABA release by a GAD inhibitor reestablishes CP-like plasticity in adult rats [60].



Thus, it seems that GABAergic neurons single-handedly regulate visual cortical plasticity, and this impression is even enhanced by the recent observation that intracortical transplantation of embryonal cells from the medial ganglionic eminence (MGE), which are destined to become GABAergic cortical interneurons, induces a period of enhanced plasticity in mice beyond the critical period [61]. Interestingly, this effect is only present during a narrow time frame when the transplanted cells have a certain cellular age (33 to 35 day) corresponding to the age they would have had during the natural critical period in normal development.

Surprising as this active time window may be, it is in line with a lot of research on the activity-dependent maturation of parvalbumin-containing interneurons in the visual cortex. Before and during the critical period for ocular dominance plasticity, the strength of cortical inhibition triples. This increase is prevented by dark rearing which also delays the critical period [62]. Further research specified that the number of perisomatic boutons around pyramidal cells in the visual cortex increases until postnatal day 28, which marks the peak of the critical period; again, visual deprivation prevented the increase [63]. These results imply that the maturation of basket cells is necessary for the start of the critical period for ocular dominance plasticity, and they show that this maturation is activity dependent. As mentioned above, transsynaptic transfer of the homeoprotein Otx2 from the retina, which is triggered by light perception, has been shown to induce the maturation of parvalbumin-containing interneurons and the start of the critical period [55]. A high concentration of polysialic acid (PSA), which traps Otx2 [64], has been shown to prevent the start of the critical period, such that premature removal of PSA leads to an earlier maturation of parvalbumin-expressing cells and a preponed critical period [65]. Recent work has elucidated to a large degree the cell-autonomous mechanisms that promote the developmental synapse formation in basket cells: a knockdown of the GABA-synthesizing enzyme GAD67 leads to deficits in axon branching and perisomatic synapse formation, whereas overexpression of GAD67 speeds up these processes [66], (see [67] for review). Thus, inhibitory innervation patterns are regulated by the cell's own activity, which in turn depends on GABA synthesis. An interesting recent twist in this story is the finding that the complete blockade of GABA synthesis in single cells does not, as one would expect, shrink axonal arbors drastically, but contrariwise increases their density and complexity [68]. The authors of that study suggest a model according to which basket cells make tentative contacts with many potential postsynaptic targets, which are pruned or stabilized by synaptic activity. While little activity is sufficient to remove, but not to stabilize connections, complete blockade allows for neither and therefore keeps axonal complexity and synapse number high [68]. In summary, visual stimulation induces the maturation of parvalbumin-containing basket cells, which is internally regulated by GABAergic activity, and shifts the excitation-inhibition balance of visual cortical neurons such that critical period plasticity becomes possible.

While it seems established that GABAergic inhibition controls the level of cortical plasticity, it is much less clear in

how far GABAergic neurons are involved in the expression of plastic changes. Even after the drastic reduction of visual cortical inhibition just about the level that would evoke seizures, the ocular dominance shift evoked by monocular deprivation can be observed, and complete silencing of intracortical connections by muscimol confirms that the effective changes are expressed at thalamocortical synapses [69]. Indeed, ocular dominance plasticity is dependent on Hebbian plasticity at NMDA receptors [70–72]. Do inhibitory interneurons, then, participate in synaptic plasticity at all?

Several studies have tried to answer this question. Using calcium imaging, one recent study showed that GABAergic neurons are more binocular, that is, less dominated by one eye, in normal mice, but show a similar shift toward the open eye after monocular deprivation during the critical period [73]. If monocular deprivation was performed after the critical period, the ocular dominance shift of GABAergic neurons was even stronger than that of excitatory neurons. Another study, however, provided somewhat conflicting results: In vivo intracellular recording from pyramidal cells and fast-spiking interneurons showed that while excitatory cells have a normal bias towards the contralateral eye which they rapidly lose after a short monocular deprivation, fast-spiking interneurons were unbiased at the outset, showed a paradoxical shift towards the closed eye after short deprivation, and only shifted on to an ipsilateral bias after longer deprivation periods [74]. The discrepancies may arise from differences in anaesthesia and method or simply from the fact that the latter study focused on fast-spiking, parvalbumin-containing interneurons which play a central role in regulating the critical period for ocular dominance plasticity, whereas the Kameyama study did not distinguish among GABAergic neuronal subtypes. Both studies agree, however, that intracortical inhibition changes in response to monocular deprivation, and in adult plasticity, this change may even have a stronger influence on network function than the relatively small change in excitatory transmission [73].

In another primary sensory area, the somatosensory cortex, the role of GABAergic interneurons in the response to sensory deprivation has been firmly established in recent years (see [75] for review). If a single row of whiskers was removed in mice starting on postnatal day 7, the number of parvalbumin-positive interneurons was significantly reduced in the cortical barrels representing that row, whereas it was increased in adjacent barrels [76]. This loss of parvalbumin expression went along with a lower number of perisomatic synaptic varicosities and weaker inhibitory transmission, an effect that required experience-dependent release of BDNF [77]. Further research confirmed the reduction in parvalbumin expression and showed that, upon whisker trimming, fast-spiking interneurons in the barrel cortex, but not other kinds of nonpyramidal cells, become less excitable, while their excitatory thalamocortical input is reduced [78]. Interestingly, these findings are somewhat at variance with earlier research demonstrating that in rats in which a row of whiskers was plucked between postnatal days 1 and 60, the number of GABAergic synapses on dendritic spines, but not on somata, was strongly reduced in the deprived barrels [79] (see [80] for review). A potential approach



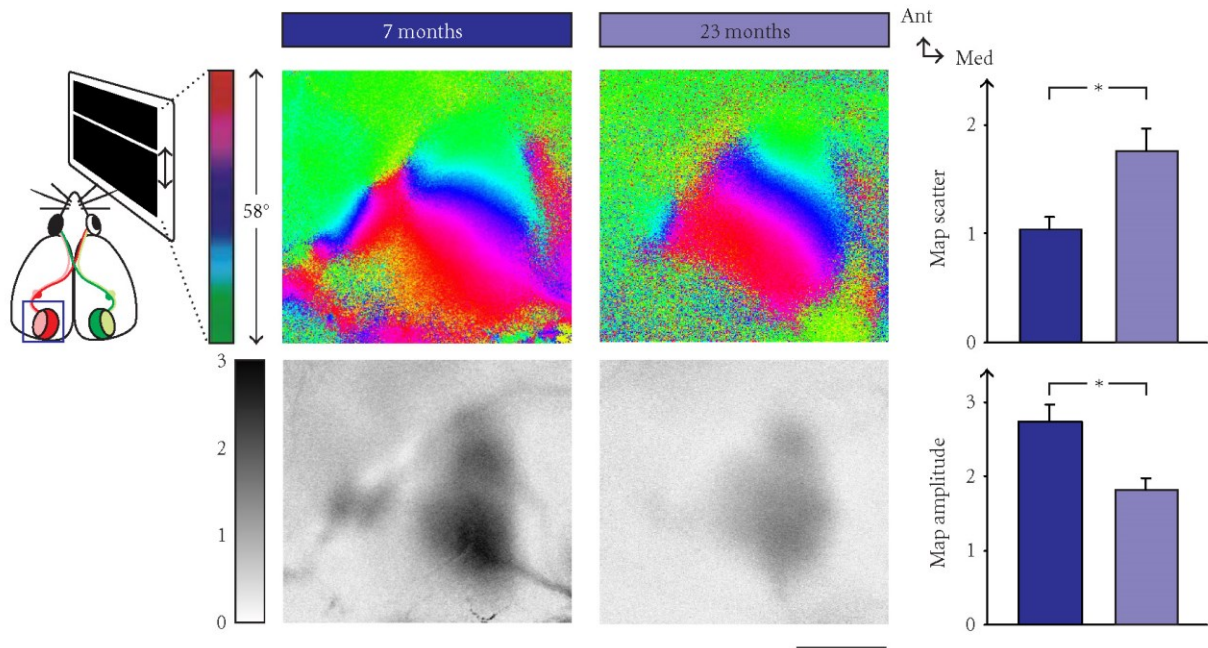


FIGURE 8: Visual cortical maps deteriorate in old age. Retinotopic phase maps (colour-coded according to scheme on the top left) and corresponding activity maps (coded according to grey scale on the left) are shown for mice of seven and 23 months. Map scatter increases in old mice, while the amplitude decreases. Scale bar is 1 mm and applies to all panels showing maps.

to reconcile these conflicting results might be that whisker trimming at a very early age delays the maturation of cortical inhibition in a similar way as dark rearing does in the visual cortex. Here, this kind of deprivation also results in reduced parvalbumin expression [81]. As parvalbumin-positive interneurons mature quickly before the onset of the critical period for ocular dominance plasticity in the visual cortex [63, 82], so they do in the somatosensory cortex between postnatal days 10 and 30 [83]. It is conceivable that only a longer period of deprivation (two months in [79]) allows for the full adaptation to changed input.

Although such issues still need to be clarified, it appears that the mechanisms regulating sensory plasticity are similar in different cortical areas (see [84] for review), involving the expression of parvalbumin and the formation of perisomatic synapses by basket interneurons in both the somatosensory and the visual cortex. In the auditory cortex, too, similar processes seem to control critical period plasticity [85, 86]. This uniformity of function across the neocortex holds a promise for our ability to understand cortical plasticity, but a lot of work still remains to be done to understand the cellular and network mechanisms by which plasticity is enabled.

## 5. Age-Related Decline of Inhibition and Signal Processing

Perceptual sensitivity declines in old age. In aged humans, visual acuity and contrast sensitivity decline in an accelerated fashion [87–89]. In order to test in how far mice might serve as an animal model of age-related vision loss in humans, we have just shown that, in pigmented mice, too, visual acuity

and contrast sensitivity deteriorate, starting at approx. 18 months of age, and the progressive loss parallels that which is seen in humans [90]. While age-related degradations in the sensory organs certainly impair access to the environment, there has been a long-standing notion that central nervous changes may also contribute to the decline in visual or somatosensory function [91, 92]. Indeed, we could show in the same study that visual cortical activity, as measured by optical imaging of intrinsic signals, and cortex-dependent behavioural plasticity were strongly reduced in old mice (Figure 8, [90]).

A precise connection between cellular changes and visual function loss in old animals has been achieved in macaques. In these animals, orientation tuning of visual cortical neurons is reduced to the point of being scarcely detectable [93, 94]. Electrophoretic application of GABA or the GABA agonist muscimol to the recorded neurons, however, restored orientation selectivity similar to that seen in young animals, whereas the GABA receptor antagonist bicuculline abolished orientation tuning in visual cortical neurons of young monkeys [94]. A similar degradation of visual cortical function, that is, decreased orientation sensitivity, higher spontaneous activity, and lower signal-to-noise ratio, was observed in aged cats and, partly, in rats [95, 96]. Looking for the reason of this decrease in intracortical inhibition, Hua and colleagues [97] found the density and proportion of GABA-immunopositive neurons in the cat visual cortex to be decreased by about half in old compared to young animals, whereas there was no change in the number of excitatory neurons.

Does this loss of inhibitory interneurons affect all GABAergic subtypes equally? In humans and dogs it appears that basket cells characterised by parvalbumin are remarkably resilient to old age [98, 99]. This fits to the most recent finding that the activity of parvalbumin-containing interneurons has almost no effect on the orientation tuning of visual cortical pyramidal cells [100], whereas a genetically induced loss of dendrite-targeting interneurons leads to impaired orientation tuning in the mouse visual cortex [101]. The density of calbindin-immunoreactive interneurons, in contrast, is diminished in almost all of the aged human brain, but significantly so only in a few areas, among them the primary visual cortex [98]. The density of calretinin-positive neurons is also affected by age, but mostly in temporal areas. Somewhat conflicting results were found in the somatosensory and motor cortices of rats, where the density of both parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons was found to be decreased in old animals [102]. It is as yet unclear whether the discrepancy concerning parvalbumin-positive cells is due to differences in brain region, strain, or species. It appears certain, however, that some kinds of GABAergic interneurons are lost during ageing and that this loss may be the reason for the functional degradation found in old animals. This knowledge may provide a basis for future therapeutic interventions.

## 6. Conclusions

Despite being only a minority of all cortical neurons, inhibitory interneurons have a key role in modulating cortical function and plasticity, and even subtle impairments to the integrity of these cells can lead to severe neuronal and psychiatric disturbances. It is therefore crucial to understand the development of GABAergic interneurons, their integration into cortical circuits, and the factors necessary for their preservation. In consequence, it might become possible to treat neuronal disorders at their basic circuit level.

## Acknowledgment

The authors thank Falk Nitzsche for providing Figures 5 and 6.

## References

- [1] S. R. Y. Cajal, "Structure and connections of neurons," *Bulletin of the Los Angeles Neurological Society*, vol. 17, no. 1-2, pp. 5-46, 1952.
- [2] E. G. Jones, "Varieties and distribution of non pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 160, no. 2, pp. 205-267, 1975.
- [3] J. DeFelipe, "Cortical interneurons: from Cajal to 2001," *Progress in Brain Research*, vol. 136, pp. 215-238, 2002.
- [4] Y. Kawaguchi and S. Kondo, "Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex," *Brain Cell Biology*, vol. 31, no. 3-5, pp. 277-287, 2002.
- [5] R. Batista-Brito and G. Fishell, "Chapter 3 the developmental integration of cortical interneurons into a functional network," *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 87, pp. 81-118, 2009.
- [6] H. Markram, M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, A. Gupta, G. Silberberg, and C. Wu, "Interneurons of the neocortical inhibitory system," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 5, no. 10, pp. 793-807, 2004.
- [7] G. A. Ascoli, L. Alonso-Nanclares, S. A. Anderson et al., "Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 9, no. 7, pp. 557-568, 2008.
- [8] R. Batista-Brito, R. MacHold, C. Klein, and G. Fishell, "Gene expression in cortical interneuron precursors is prescient of their mature function," *Cerebral Cortex*, vol. 18, no. 10, pp. 2306-2317, 2008.
- [9] G. Sanacora, G. F. Mason, and J. H. Krystal, "Impairment of GABAergic transmission in depression: new insights from neuroimaging studies," *Critical Reviews in Neurobiology*, vol. 14, no. 1, pp. 23-45, 2000.
- [10] J. M. Rennie and G. B. Boylan, "Neonatal seizures and their treatment," *Current Opinion in Neurology*, vol. 16, no. 2, pp. 177-181, 2003.
- [11] P. Levitt, "Developmental neurobiology and clinical disorders: lost in translation?" *Neuron*, vol. 46, no. 3, pp. 407-412, 2005.
- [12] D. A. Lewis, T. Hashimoto, and D. W. Volk, "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 4, pp. 312-324, 2005.
- [13] P. Levitt, K. L. Eagleson, and E. M. Powell, "Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders," *Trends in Neurosciences*, vol. 27, no. 7, pp. 400-406, 2004.
- [14] P. Rakic, "Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 25, pp. 11323-11327, 1995.
- [15] A. A. Lavdas, M. Grigoriou, V. Pachnis, and J. G. Parnavelas, "The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex," *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 18, pp. 7881-7888, 1999.
- [16] J. G. Parnavelas, S. A. Anderson, A. A. Lavdas, M. Grigoriou, V. Pachnis, and J. L. R. Rubenstein, "The contribution of the ganglionic eminence to the neuronal cell types of the cerebral cortex," *Novartis Foundation Symposium*, vol. 228, pp. 129-147, 2000.
- [17] S. A. Anderson, O. Marín, C. Horn, K. Jennings, and J. L. R. Rubenstein, "Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences," *Development*, vol. 128, no. 3, pp. 353-363, 2001.
- [18] O. Marín and J. L. R. Rubenstein, "A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 2, no. 11, pp. 780-790, 2001.
- [19] S. Nery, H. Wichterle, and G. Fishell, "Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain," *Development*, vol. 128, no. 4, pp. 527-540, 2001.
- [20] H. Wichterle, D. H. Turnbull, S. Nery, G. Fishell, and A. Alvarez-Buylla, "In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain," *Development*, vol. 128, no. 19, pp. 3759-3771, 2001.
- [21] L. R. Hernández-Miranda, J. G. Parnavelas, and F. Chiara, "Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons," *ASN Neuro*, vol. 2, no. 2, pp. 75-86, 2010.

- [22] E. Rossignol, "Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders," *Neural Plasticity*, vol. 2011, Article ID 649325, 2011.
- [23] O. Marín, A. Yaron, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, and J. L. R. Rubenstein, "Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 872–875, 2001.
- [24] W. Andrews, M. Barber, L. R. Hernandez-Miranda et al., "The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons," *Developmental Biology*, vol. 313, no. 2, pp. 648–658, 2008.
- [25] N. Flames, J. E. Long, A. N. Garratt et al., "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1," *Neuron*, vol. 44, no. 2, pp. 251–261, 2004.
- [26] J. G. Flanagan and P. Vanderhaeghen, "The ephrins and Eph receptors in neural development," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 21, pp. 309–345, 1998.
- [27] J. P. Himanen, M. J. Chumley, M. Lackmann et al., "Repelling class discrimination: Ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling," *Nature Neuroscience*, vol. 7, no. 5, pp. 501–509, 2004.
- [28] A. Martínez and E. Soriano, "Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system," *Brain Research Reviews*, vol. 49, no. 2, pp. 211–226, 2005.
- [29] A. Davy and P. Soriano, "Ephrin signaling in vivo: look both ways," *Developmental Dynamics*, vol. 232, no. 1, pp. 1–10, 2005.
- [30] R. Klein, "Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling," *Nature Neuroscience*, vol. 12, no. 1, pp. 15–20, 2009.
- [31] J. Egea and R. Klein, "Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance," *Trends in Cell Biology*, vol. 17, no. 5, pp. 230–238, 2007.
- [32] J. Rudolph, G. Zimmer, A. Steinecke, S. Barchmann, and J. Bolz, "Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon," *Cell Adhesion and Migration*, vol. 4, no. 3, pp. 400–408, 2010.
- [33] G. Zimmer, J. Rudolph, J. Landmann et al., "Bidirectional EphrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream," *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 50, pp. 18364–18380, 2011.
- [34] G. Zimmer, P. Garcez, J. Rudolph et al., "Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons," *European Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 62–73, 2008.
- [35] A. Steinecke, J. Rudolph, G. Zimmer, S. Barchmann, and J. Bolz, "A dual role of EphA4 signaling in the basal telencephalon during interneuron migration," *Society for Neuroscience, Abstract*, 2010, Neuroscience Meeting Planner.
- [36] D. H. Blackwood, P. M. Visscher, and W. J. Muir, "Genetic studies of bipolar affective disorder in large families," *The British Journal of Psychiatry*, vol. 41, pp. s134–s136, 2001.
- [37] J. E. Chubb, N. J. Bradshaw, D. C. Soares, D. J. Porteous, and J. K. Millar, "The DISC locus in psychiatric illness," *Molecular Psychiatry*, vol. 13, no. 1, pp. 36–64, 2008.
- [38] N. J. Brandon and A. Sawa, "Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 12, no. 12, pp. X707–X722, 2011.
- [39] N. J. Brandon, J. K. Millar, C. Korth, H. Sive, K. K. Singh, and A. Sawa, "Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development," *Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 41, pp. 12768–12775, 2009.
- [40] A. Kamiya, K. I. Kubo, T. Tomoda et al., "A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development," *Nature Cell Biology*, vol. 7, no. 12, pp. 1067–1078, 2005.
- [41] T. L. Young-Pearse, S. Suth, E. S. Luth, A. Sawa, and D. J. Selkoe, "Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 31, pp. 10431–10440, 2010.
- [42] N. J. Brandon, E. J. Handford, I. Schurov et al., "Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 25, no. 1, pp. 42–55, 2004.
- [43] Q. Wang and N. J. Brandon, "Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 48, no. 4, pp. 359–364, 2011.
- [44] A. Steinecke, C. Gampe, C. Valkova, C. Kaether, and J. Bolz, "Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 2, pp. 738–745, 2012.
- [45] D. A. Lewis and P. Levitt, "Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 25, pp. 409–432, 2002.
- [46] P. Kalus, D. Senitz, and H. Beckmann, "Disturbances of corticogenesis in schizophrenia: morphological findings provide new evidence for the maldevelopmental hypothesis," *Neuropsychobiology*, vol. 40, no. 1, pp. 1–13, 1999.
- [47] F. Bagorda, G. Teuchert-Noodt, and K. Lehmann, "Isolation rearing or methamphetamine traumatization induce a "dysconnection" of prefrontal efferents in gerbils: implications for schizophrenia," *Journal of Neural Transmission*, vol. 113, no. 3, pp. 365–379, 2006.
- [48] B. S. Wang, R. Sarnaik, and J. Cang, "Critical period plasticity matches binocular orientation preference in the visual cortex," *Neuron*, vol. 65, no. 2, pp. 246–256, 2010.
- [49] D. H. Hubel and T. N. Wiesel, "The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens," *Journal of Physiology*, vol. 206, no. 2, pp. 419–436, 1970.
- [50] J. A. Gordon and M. P. Stryker, "Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse," *Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 10, pp. 3274–3286, 1996.
- [51] K. Lehmann and S. Löwel, "Age-dependent ocular dominance plasticity in adult mice," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 9, Article ID e3120, 2008.
- [52] T. K. Hensch, M. Fagiolini, N. Mataga, M. P. Stryker, S. Baekkeskov, and S. F. Kash, "Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex," *Science*, vol. 282, no. 5393, pp. 1504–1508, 1998.
- [53] M. Fagiolini and T. K. Hensch, "Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex," *Nature*, vol. 404, no. 6774, pp. 183–186, 2000.
- [54] T. K. Hensch, "Critical period regulation," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 27, pp. 549–579, 2004.
- [55] S. Sugiyama, A. A. Di Nardo, S. Aizawa et al., "Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity," *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 508–520, 2008.
- [56] J. L. Hanover, Z. J. Huang, S. Tonegawa, and M. P. Stryker, "Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex," *The*



- Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 22, p. RC40, 1999.
- [57] Z. J. Huang, A. Kirkwood, T. Pizzorusso et al., "BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex," *Cell*, vol. 98, no. 6, pp. 739–755, 1999.
  - [58] J. F. M. Vetencourt, A. Sale, A. Viegi et al., "The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex," *Science*, vol. 320, no. 5874, pp. 385–388, 2008.
  - [59] A. Sale, J. F. Maya Vetencourt, P. Medini et al., "Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition," *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 6, pp. 679–681, 2007.
  - [60] A. Harauzov, M. Spolidoro, G. DiCristo et al., "Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 1, pp. 361–371, 2010.
  - [61] D. G. Southwell, R. C. Froemke, A. Alvarez-Buylla, M. P. Stryker, and S. P. Gandhi, "Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation," *Science*, vol. 327, no. 5969, pp. 1145–1148, 2010.
  - [62] B. Morales, S. Y. Choi, and A. Kirkwood, "Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex," *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 18, pp. 8084–8090, 2002.
  - [63] B. Chattopadhyaya, G. Di Cristo, H. Higashiyama et al., "Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 43, pp. 9598–9611, 2004.
  - [64] A. H. Joliot, A. Triller, M. Volovitch, C. Pernelle, and A. Prochiantz, " $\alpha$ -2,8-polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide," *New Biologist*, vol. 3, no. 11, pp. 1121–1134, 1991.
  - [65] G. Di Cristo, B. Chattopadhyaya, S. J. Kuhlman et al., "Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity," *Nature Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 1569–1577, 2007.
  - [66] B. Chattopadhyaya, G. Di Cristo, C. Z. Wu et al., "GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex," *Neuron*, vol. 54, no. 6, pp. 889–903, 2007.
  - [67] Z. J. Huang, G. Di Cristo, and F. Ango, "Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 9, pp. 673–686, 2007.
  - [68] X. Wu, Y. Fu, G. Knott, J. Lu, G. D. Cristo, and Z. Josh Huang, "GABA signaling promotes synapse elimination and axon pruning in developing cortical inhibitory interneurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 1, pp. 331–343, 2012.
  - [69] L. A. Khibnik, K. K. A. Cho, and M. F. Bear, "Relative contribution of feedforward excitatory connections to expression of ocular dominance plasticity in layer 4 of visual cortex," *Neuron*, vol. 66, no. 4, pp. 493–500, 2010.
  - [70] A. Kleinschmidt, M. F. Bear, and W. Singer, "Blockade of 'NMDA' receptors disrupts experience dependent plasticity of kitten striate cortex," *Science*, vol. 238, no. 4825, pp. 355–358, 1987.
  - [71] N. B. Sawtell, M. Y. Frenkel, B. D. Philpot, K. Nakazawa, S. Tonegawa, and M. F. Bear, "NMDA receptor-dependent ocular dominance plasticity in adult visual cortex," *Neuron*, vol. 38, no. 6, pp. 977–985, 2003.
  - [72] M. Sato and M. P. Stryker, "Distinctive features of adult ocular dominance plasticity," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 41, pp. 10278–10286, 2008.
  - [73] K. Kameyama, K. Sohya, T. Ebina, A. Fukuda, Y. Yanagawa, and T. Tsumoto, "Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons," *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 4, pp. 1551–1559, 2010.
  - [74] Y. Yazaki-Sugiyama, S. Kang, H. Cateau, T. Fukai, and T. K. Hensch, "Bidirectional plasticity in fast-spiking GABA circuits by visual experience," *Nature*, vol. 462, no. 7270, pp. 218–221, 2009.
  - [75] Q. Q. Sun, "The missing piece in the 'use it or lose it' puzzle: is inhibition regulated by activity or does it act on its own accord?" *Reviews in the Neurosciences*, vol. 18, no. 3–4, pp. 295–310, 2007.
  - [76] Y. Jiao, C. Zhang, Y. Yanagawa, and Q. Q. Sun, "Major effects of sensory experiences on the neocortical inhibitory circuits," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 34, pp. 8691–8701, 2006.
  - [77] Y. Jiao, Z. Zhang, C. Zhang et al., "A key mechanism underlying sensory experience-dependent maturation of neocortical GABAergic circuits in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 29, pp. 12131–12136, 2011.
  - [78] Q. Q. Sun, "Experience-dependent intrinsic plasticity in interneurons of barrel cortex layer IV," *Journal of Neurophysiology*, vol. 102, no. 5, pp. 2955–2973, 2009.
  - [79] K. D. Micheva and C. Beaulieu, "An anatomical substrate for experience-dependent plasticity of the rat barrel field cortex," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 25, pp. 11834–11838, 1995.
  - [80] K. D. Micheva and C. Beaulieu, "Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: a review," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 75, no. 5, pp. 470–478, 1997.
  - [81] T. Pizzorusso, P. Medini, N. Berardi, S. Chierzi, J. W. Fawcett, and L. Maffei, "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex," *Science*, vol. 298, no. 5596, pp. 1248–1251, 2002.
  - [82] M. S. Lazarus and Z. Josh Huang, "Distinct maturation profiles of perisomatic and dendritic targeting GABAergic interneurons in the mouse primary visual cortex during the critical period of ocular dominance plasticity," *Journal of Neurophysiology*, vol. 106, no. 2, pp. 775–787, 2011.
  - [83] K. D. Micheva and C. Beaulieu, "Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 373, no. 3, pp. 340–354, 1996.
  - [84] K. Fox and R. O. L. Wong, "A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems," *Neuron*, vol. 48, no. 3, pp. 465–477, 2005.
  - [85] E. De Villiers-Sidani, K. L. Simpson, Y. F. Lu, R. C. S. Lin, and M. M. Merzenich, "Manipulating critical period closure across different sectors of the primary auditory cortex," *Nature Neuroscience*, vol. 11, no. 8, pp. 957–965, 2008.
  - [86] T. R. Barkat, D. B. Polley, and T. K. Hensch, "A critical period for auditory thalamocortical connectivity," *Nature Neuroscience*, vol. 14, pp. 1189–1194, 2011.
  - [87] L. Frisen and M. Frisen, "How good is normal visual acuity? A study of letter acuity thresholds as a function of age," *Albrecht von Graefes Archiv fur Klinische und Experimentelle Ophthalmologie*, vol. 215, no. 3, pp. 149–157, 1980.
  - [88] D. B. Elliott, K. C. H. Yang, and D. Whitaker, "Visual acuity changes throughout adulthood in normal, healthy eyes: seeing beyond 6/6," *Optometry and Vision Science*, vol. 72, no. 3, pp. 186–191, 1995.

- [89] T. Ferrer-Blasco, J. M. González-Méijome, and R. Montés-Micó, "Age-related changes in the human visual system and prevalence of refractive conditions in patients attending an eye clinic," *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, vol. 34, no. 3, pp. 424–432, 2008.
- [90] K. Lehmann, K.-F. Schmidt, and S. Löwel, "Vision and visual plasticity in ageing mice," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 30, no. 2, pp. 161–178, 2012.
- [91] P. D. Spear, "Neural bases of visual deficits during aging," *Vision Research*, vol. 33, no. 18, pp. 2589–2609, 1993.
- [92] B. Godde, T. Berkefeld, M. David-Jürgens, and H. R. Dinse, "Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 26, no. 7, pp. 743–752, 2002.
- [93] M. T. Schmolesky, Y. Wang, M. Pu, and A. G. Leventhal, "Degradation of stimulus selectivity of visual cortical cells in senescent rhesus monkeys," *Nature Neuroscience*, vol. 3, no. 4, pp. 384–390, 2000.
- [94] A. G. Leventhal, Y. Wang, M. Pu, Y. Zhou, and Y. Ma, "GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys," *Science*, vol. 300, no. 5620, pp. 812–815, 2003.
- [95] T. Hua, X. Li, L. He, Y. Zhou, Y. Wang, and A. G. Leventhal, "Functional degradation of visual cortical cells in old cats," *Neurobiology of Aging*, vol. 27, no. 1, pp. 155–162, 2006.
- [96] H. Wang, X. Xie, X. Li, B. Chen, and Y. Zhou, "Functional degradation of visual cortical cells in aged rats," *Brain Research*, vol. 1122, no. 1, pp. 93–98, 2006.
- [97] T. Hua, C. Kao, Q. Sun, X. Li, and Y. Zhou, "Decreased proportion of GABA neurons accompanies age-related degradation of neuronal function in cat striate cortex," *Brain Research Bulletin*, vol. 75, no. 1, pp. 119–125, 2008.
- [98] J. Bu, V. Sathyendra, N. Nagykeri, and C. Geula, "Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex," *Experimental Neurology*, vol. 182, no. 1, pp. 220–231, 2003.
- [99] M. Pugliese, J. L. Carrasco, M. C. Geloso, J. Mascort, F. Michetti, and N. Mahy, "γ-aminobutyric acidergic interneuron vulnerability to aging in canine prefrontal cortex," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 77, no. 6, pp. 913–920, 2004.
- [100] B. V. Atallah, W. Bruns, M. Carandini, and M. Scanziani, "Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli," *Neuron*, vol. 73, no. 1, pp. 159–170, 2012.
- [101] R. Mao, J. Schummers, U. Knoblich et al., "Influence of a subtype of inhibitory interneuron on stimulus-specific responses in visual cortex," *Cerebral Cortex*, vol. 22, no. 3, pp. 493–508, 2012.
- [102] R. Miettinen, J. Sirvio, P. Riekkinen, M. P. Laakso, M. Riekkinen, and P. Riekkinen, "Neocortical, hippocampal and septal parvalbumin- and somatostatin-containing neurons in young and aged rats: correlation with passive avoidance and water maze performance," *Neuroscience*, vol. 53, no. 2, pp. 367–378, 1993.